



**Miguel Ângelo Mouta  
Martins Aroso**

**Proteómica das Glândulas Lacrimais: Estudo da  
Acção da *Ecstasy***



**Miguel Ângelo Mouta  
Martins Aroso**

**Proteómica das Glândulas Lacrimais: Estudo da  
Acção da *Ecstasy***

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Métodos Biomoleculares Avançados, realizada sob a orientação científica do Dr. Francisco Manuel Lemos Amado, Professor auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

## **o júri**

presidente

**Prof. Dr. Artur Manuel Soares da Silva**

professor catedrático do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

**Prof. Dr. Félix Dias Carvalho**

professor associado da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

**Prof. Dr. Francisco Manuel Lemos Amado**

professor auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

## **agradecimentos**

No decorrer do Mestrado, muitos foram os que me ajudaram na realização deste trabalho. Quero deixar um especial agradecimento:

Ao meu orientador, Doutor Francisco Amado, pelos seus ensinamentos e conhecimento científico fundamentais para a realização deste trabalho, pela sua disponibilidade e boa disposição constante e pelo seu exemplo de dedicação, trabalho e busca de conhecimento. Foi, para mim, um orgulho trabalhar sobre a sua orientação.

Ao Doutor Rui Vitorino pelos seus ensinamentos e incansável acompanhamento e ajuda ao longo de todo o trabalho laboratorial e escrita da dissertação. Também pela sua amizade e generosidade que me servem de inspiração.

Ao Doutor José Alberto Ramos Duarte pela colaboração na realização do trabalho experimental.

Ao grupo de Toxicologia da Faculdade de Farmácia do Porto pela colaboração na realização do protocolo animal e pela gentil cedência da MDMA.

À Cristina pela ajuda, acompanhamento, incentivo e boa disposição inesgotável ao longo deste trabalho.

Ao José Alberto pela ajuda e companhia nas maratonas de trabalho experimental.

A todo o grupo da massa pela amizade, boa disposição e incentivo ao longo do trabalho. Foi um prazer trabalhar com este grupo.

À Vânia e ao Pedro, amigos incansáveis no apoio e incentivo à realização deste trabalho.

Aos colegas de mestrado pela partilha de experiências e pelos saudáveis momentos de descontração e diversão.

Aos meus pais e irmãos por sempre me ajudarem a ultrapassar as dificuldades e por permanecerem ao meu lado em todas as fases da minha vida.

## palavras-chave

Proteómica, Glândula lacrimal, *Ecstasy*, MDMA, Estimulo Simpaticomimético, Análise morfológica, Electroforese Bidimensional, MALDI/TOF/TOF

## resumo

As lágrimas são de grande importância na saúde ocular, cite-se como exemplo o síndrome do olho seco (DES), que afecta milhões de pessoas todos os anos. A glândula lacrimal, principal responsável pela constituição das lágrimas, modula a sua secreção de acordo com estimulação parassimpática e simpática, sendo, por isso, afectada por medicação tópica ou sistémica. Assim, nos últimos anos tem havido um interesse crescente no estudo da composição proteica do fluido lacrimal e da relação dessa composição com diferentes estímulos da glândula lacrimal. A *Ecstasy* (3,4-metilenodioximetanfetamina, MDMA) é a terceira droga ilegal mais utilizada, depois da *cannabis* e anfetamina e é um composto simpaticomimético de acção indirecta, afectando a secreção glandular. O objectivo deste trabalho foi avaliar o efeito, ao tempo de uma e 24 horas, da MDMA na expressão proteica da glândula lacrimal após administração aguda em rato e determinar a distribuição da MDMA em diferentes tecidos de rato.

A MDMA foi quantificada, após hidrólise ácida e extracção em fase sólida das amostras, por espectrometria de massa (Triplo-Quadrupolo). Ao tempo de 1 hora, concentração de MDMA na glândula lacrimal é bastante elevada relativamente aos restantes tecidos. Para a análise da expressão proteica da glândula lacrimal e de forma a reduzir a complexidade do proteoma glandular efectuou-se o fraccionamento subcelular desta glândula, obtendo-se a fracção enriquecida do citoplasma. Esta fracção foi separada por 2DE e as proteínas identificadas por espectrometria de massa (MALDI/TOF/TOF). A comparação de géis 2DE, análise esta realiza com o software PDQuest, permitiu observar uma variação da abundância relativa, após administração de MDMA, de proteínas relacionadas com a defesa antioxidante, o metabolismo celular, a actividade proteolítica e a síntese proteica. A análise por microscopia electrónica de transmissão (TEM) revelou que ao tempo de 1 hora a MDMA provoca desgranulação das células acinares e alteração de várias estruturas celulares e da membrana citoplasmática, indicativo de stresse celular. Às 24 horas há apenas indícios de recuperação celular.

## keywords

Proteomics, Lacrimal Gland, *Ecstasy*, MDMA, Sympathomimetic Stimulus, Morphologic Analysis, Bidimensional Electrophoresis, MALDI/TOF/TOF

## abstract

Tears are of most importance in ocular health, as an example it can be considered the dry eye syndrome (DES) that affects millions of patients every year. The lacrimal gland, the main contributor for the constitution of tears, modulates the secretion accordingly with the parasympathetic and/or sympathetic stimulation. Therefore, it's affected by topic or systemic medication. In the last years, there has been an increased interest in studying the protein composition of tear fluids as well as the relationship between protein composition and physiological variations. *Ecstasy* (3,4-methylenedioxymethamphetamine, MDMA) is the third illegal drug more abused after *cannabis* and amphetamine and is an indirectly acting sympathomimetic, stimulating in this way the glandular secretion. The goal of this work was to evaluate the action, at time 1 hour and 24 hours, of the MDMA in the lacrimal gland protein expression after acute administration in mouse and evaluate the distribution of the MDMA in different organs of mouse.

MDMA was quantified, after acidic hydrolysis and solid phase extraction of the different samples, with mass spectrometry (Triple-Quadrupole). At the time of 1 hour the concentration determined in the lacrimal gland is high when compared with other organs. For the proteomic analysis, in order to reduce the complexity of the glandular proteome, it was obtained a subcellular fraction rich in cytoplasm. This fraction was separated by 2DE and the proteins were identified by mass spectrometry (MALDI/TOF/TOF). By comparing 2D gels from different samples using the software PDQuest, it was observed that the proteins related with antioxidant activity, metabolism, proteolytic activity and protein synthesis, had a variation of the relative abundance when compared with the control, after the administration of MDMA. The analysis of the lacrimal gland by transmission electron microscopy (TEM) showed that MDMA, at the time of 1 hour, stimulates the degranulation of the acinar cells and induces structural alterations of various organelles and the cytoplasmic membrane. This is indicative of strong cellular stress. At time of 24 hours after administration of MDMA it was observed some recuperation of the acinar cells.

---

## ÍNDICE GERAL

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>3</b>
1.1. Glândula lacrimal	6
1.1.1. Localização e estrutura	6
1.1.2. Filme lacrimal	7
1.1.3. Enervação – Estimulação por via simpática	7
1.1.4. Composição do fluido lacrimal	9
1.1.5. Análise proteómica do fluido lacrimal	12
1.1.6. Grânulos Secretores	14
1.2. Drogas simpaticomiméticas	16
1.3. 3,4-Metilenodioximetanfetamina (MDMA)	18
1.3.1. Aspectos históricos	18
1.3.2. Farmacocinética	19
1.3.3. Acção farmacológica	21
1.3.4. Métodos de análise da 3,4-metilenodioximetanfetamina	21
1.4. Técnicas de análise em proteómica	23
1.4.1. Espectrometria de massa em proteómica	24
1.4.1.1. Fonte Iónica	24
1.4.1.2. Analisadores de iões	25
1.4.1.3. Associação entre fontes iónicas e analisadores	25
1.4.2. Géis 2DE	26
1.4.3. LC-MALDI/MS/MS e LC-ESI/MS/MS	27
1.4.4. Software para identificação proteica por espectrometria de massa	28
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>33</b>
2.1. Reagentes	33
2.2. Equipamentos	33
2.3. Procedimento experimental	34
2.4. Preparação de glândula lacrimal para microscopia electrónica de transmissão	34

2.5.	Subfraccionamento das glândulas lacrimais .....	35
2.6.	Quantificação da proteína presente nas amostras .....	35
2.7.	Electroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2DE) .....	36
2.8.	Revelação dos géis de 2-DE .....	37
2.8.1	Revelação com prata reversível .....	37
2.8.2	Revelação com coomassie coloidal.....	37
2.9.	Análise dos dados de 2DE .....	37
2.10.	Nano-HPLC de digestos trípticos de peptídeos.....	38
2.11.	Identificação de proteínas .....	38
2.11.1	Digestão das proteínas com tripsina .....	38
2.11.2	Espectrometria de massa .....	39
2.11.3	Pesquisa nas bases de dados .....	40
2.12.	Extracção e quantificação de 3,4-metilenodioximetanfetamina em diferentes amostras.....	40
2.12.1	Amostras de Urina e Plasma.....	40
2.12.2	Amostras de tecidos de rato.....	41
2.12.3	Análise da 3,4-metilenodioximetanfetamina com espectrómetro de massa Triplo-Quadrupolo .....	41
3.	RESULTADOS .....	45
3.1.	Quantificação da 3,4-metilenodioximetanfetamina.....	45
3.2.	Caracterização da fracção subcelular de glândula parótida.....	49
3.2.1.	Caracterização por 2DE.....	49
3.2.2.	Caracterização proteica por LC-MALDI/TOF/TOF .....	56
3.3.	Análise morfológica das glândulas lacrimais .....	58
4.	DISCUSSÃO .....	63
5.	CONCLUSÃO .....	73
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77



**ÍNDICE DE FIGURAS**

<b>Figura 1. Glândula lacrimal em humanos e fonte dos componentes do filme lacrimal, adaptado de Paulsen and Berry, 2006. Localização da glândula lacrimal no rato (retirado de <a href="http://kentsimmons.uwinnipeg.ca/16cm05/16labman05/lb8pg3.htm">http://kentsimmons.uwinnipeg.ca/16cm05/16labman05/lb8pg3.htm</a>)......</b>	<b>6</b>
<b>Figura 2. Esquema da regulação neuronal na glândula lacrimal, adaptado de Zoukhri (2006) .....</b>	<b>8</b>
<b>Figura 3. Aparelho de Golgi de um lactotrofo de rato, adaptado de Dannies (1999). 15</b>	<b>15</b>
<b>Figura 4. Esquema ilustrativo de análise em proteômica, adaptado de Kicman <i>et al</i> (2007). .....</b>	<b>23</b>
<b>Figura 5. Esquema representativo de um espectrómetro de massa, adaptado de Lane (2005). .....</b>	<b>24</b>
<b>Figura 6. Esquema típico de 2DE para a obtenção de mapas proteicos, adaptado de Yarmush <i>et al</i>, 2002 .....</b>	<b>26</b>
<b>Figura 7. Espectro de varrimento obtido no Triplo-Quadrupolo após ionização por electrospray, em modo positivo, do padrão MDMA (ião de <math>m/z</math> 194) de 200 ng/ml....</b>	<b>45</b>
<b>Figura 8. Espectro de varrimento obtido no Triplo-Quadrupolo após ionização por electrospray, em modo positivo, de uma amostra de rim do grupo MDMA 1h (ião de <math>m/z</math> 194).....</b>	<b>46</b>
<b>Figura 9. Espectro de varrimento obtido no Triplo-Quadrupolo após ionização por electrospray, em modo positivo, de uma amostra de urina do grupo MDMA 1h (ião de <math>m/z</math> 194).....</b>	<b>46</b>
<b>Figura 10. Espectro de massa (MS/MS) do ião de <math>m/z</math> 194 obtido a partir do padrão de MDMA de 200 ng/ml. Apresenta-se também a estrutura química da MDMA e dos fragmentos obtidos. ....</b>	<b>47</b>
<b>Figura 11. Espectro de massa (MS/MS) do ião de <math>m/z</math> 194 obtido a partir de uma amostra de fígado do grupo MDMA 1h. ....</b>	<b>47</b>
<b>Figura 12. Média das concentrações de 3,4-metilenodioximetanfetamina determinadas, em diferentes tecidos, no grupo MDMA 1h. ....</b>	<b>48</b>

- Figura 13.** Mapa 2DE revelado com coomassie da amostra do grupo MDMA 1h. Foram separados 300 µg de proteína, horizontalmente num gel IPG, pH 3-11 não linear (NL) e verticalmente num gel SDS-PAGE 12,5%. Os números correspondem aos *spots* identificados..... 50
- Figura 14.** Espectro de massa obtido por MALDI/TOF/TOF. As setas assinalam o ião de m/z 832.3508 (coomassie) e o ião de m/z 2211.1082 (autólise da tripsina) utilizados como padrão interno, e o ião de m/z 1341.6946 que corresponde a um dos peptídeos utilizados para identificação da proteína dissulfeto isomerase A3. .... 55
- Figura 15.** Espectro de massa (MS/MS) obtido para o peptídeo de m/z 1341.6946, com a sequência de aminoácidos GFPTIYFSPANK (449-460). .... 56
- Figura 16.** Distribuição, de acordo com função, das proteínas identificadas por LC-MALDI-TOF/TOF na glândula lacrimal. .... 57
- Figura 17.** Imagens obtidas por microscopia electrónica de transmissão de células acinares de glândula lacrimal do grupo controlo. Destacam-se as seguintes estruturas: Retículo Endoplasmático (ER), Complexo de Golgi (G), Grânulo Imaturo (IG), Grânulos Secretores (SG), Lúmen (L), Núcleo (N), Vaso Sanguíneo (BV). As setas indicam a presença de Mitocôndrias. .... 58
- Figura 18.** Imagens obtidas por microscopia electrónica de transmissão de células acinares de glândula lacrimal do grupo MDMA 1h e sacrificados ao tempo de 1 hora. Destacam-se as seguintes estruturas: Retículo Endoplasmático (ER), Complexo de Golgi (G), Grânulo Imaturo (IG) Grânulos Secretores (SG), Núcleo (N), Fibra Nervosa (F). As setas indicam a presença de Mitocôndrias..... 59
- Figura 19.** Imagens obtidas por microscopia electrónica de transmissão de células acinares de glândula lacrimal do grupo MDMA 24h. Destacam-se as seguintes estruturas: Vesículas múltiplas de fusão (MFV) Retículo Endoplasmático (ER), Complexo de Golgi (G), Grânulo Imaturo (IG) Grânulos Secretores (SG), Núcleo (N), Fibra Nervosa (F). As setas indicam a presença de Mitocôndrias. .... 60

**ÍNDICE DE TABELAS**

<b>Tabela 1. Principais componentes proteicos das lágrimas humanas, adaptado de Ohashi <i>et al</i> (2005). .....</b>	<b>10</b>
<b>Tabela 2. Manifestações orais em utilizadores de 3,4-metilenedioximetanfetamina, adaptado de Brazier, Dhariwal <i>et al.</i>, 2003. ....</b>	<b>17</b>
<b>Tabela 3. Concentração em µg/g das diferentes amostras analisadas de cada rato do grupo MDMA.....</b>	<b>48</b>
<b>Tabela 4. Proteínas identificadas por MALDI/TOF/TOF, após separação por 2DE. Apresenta-se a relação da densidade óptica obtida entre o grupo MDMA 1h e o controlo e entre o grupo MDMA 24h e o controlo.....</b>	<b>51</b>



---

## ABREVIATURAS

**2DE** – Electroforese Bidimensional

**5-HT** – 5-hidroxitriptamina

**$\alpha$ -MeDA** –  $\alpha$ -metildopamina

**CP** – Peptidase Cisteína

**CRP** – *Cystain-related Peptide*

**DES** – Síndrome do Olho Seco

**DEA** – *Drug Enforcement Administration*

**EC** – Electroforese Capilar

**EGF** – Factor de Crescimento Epidérmico

**ECD** – Detector de Captura de Electrões

**ESI** – Ionização por Electrospray

**ER** – Retículo Endoplasmático

**FID** – Detector de Ionização de Chama

**FT** – Transformada de Fourier

**GC-MS** – Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrómetro de Massa

**G** – Complexo de Golgi

**HPLC** – Cromatografia Líquida de Alta Pressão

**ICR** – Ressonância Ciclotrónica de Iões

**IPG** – Gradiente de pH Imobilizado

**IEF** – Focagem Isoeléctrica

**IG** – Grânulos Imaturos

**LC** – Cromatografia Líquida

**LLE** – Extracção Líquido-Líquido

**MALDI** – Ionização com Desorção por Laser Assistida pela Matriz

**MBDB** – N-metil-1-(3,4-metilenedioxifenil)-2-butanamina

**MDA** – 3,4-metilenodioxianfetamina

**MDEA** – 3,4-metilenedioxi-N-etilamfetamina

**MDMA** – 3,4-metilenodioximetanfetamina

**MM** – Massa Molecular

**MS** – Espectrometria de Massa

**N** – Núcleo

**N-Me- $\alpha$ -MeDA** – N-metil- $\alpha$ -metildopamina

**NPD** – Detector de Azoto e Fósforo

**SDS-PAGE** – Dodecil Sulfato de Sódio - Electroforese em Gel de Poliacrilamida

**PI** – Ponto Isoelétrico

**PMA** – Parametoxianfetamina

**PRP** – Proteína Rica em Prolina

**SNC** – Sistema Nervoso Central

**SG** – Grânulos Secretores

**SPE** – Extracção em Fase Sólida

**SPME** – Micro-Extracção em Fase Sólida

**SS** – Síndrome de Sjögren

**TGN** – Rede Trans do Golgi

**TOF** – Analisador de Tempo-de-voo

**TQ** – Triplo-Quadrupolo

**VIP** – Peptídeo Intestinal Vasoactivo

# INTRODUÇÃO





## 1. INTRODUÇÃO

A glândula lacrimal é uma glândula exócrina multilobular, tubuloacinar que recebe inervação sensorial parassimpática e simpática. (Johnson and Murphy 2004). A sua função primária é a de secretar proteínas, electrólitos e água para a superfície ocular. As células acinares, responsáveis pela produção e exocitose regulada de proteínas e fluido, são o principal tipo de células na glândula lacrimal. (Wu, Jerdeva *et al.* 2006) Tanto a quantidade como a composição do fluido secretado pela glândula lacrimal são críticos para a manutenção da superfície ocular saudável e livre de patologias, sendo necessário que a secreção granular seja firmemente regulada. Uma alteração na regulação nervosa leva a alterações no volume e/ou composição do fluido da glândula lacrimal, comprometendo a saúde da superfície ocular levando à síndrome do olho seco (DES), que afecta milhões de pessoas todos os anos. (Dartt 2001; Barabino and Dana 2004; Wu, Jerdeva *et al.* 2006)

A *Ecstasy* (3,4- metilenodioximetanfetamina, MDMA) é a terceira droga ilegal mais utilizada, depois da *cannabis* e anfetamina. Devido a este facto, tem havido um interesse crescente nos efeitos adversos da sua utilização, com particular atenção dada a alguns casos fatais associados ao consumo de *ecstasy*, e aos efeitos neurotóxicos provocados por esta substância. Apesar da ocorrência de episódios de efeitos agudos relacionados com a toma de *ecstasy* ser baixa, a imprevisibilidade destes episódios, o risco de morte e a significativa morbilidade, tornam relevantes as consequências para a saúde provenientes da sua utilização. (Burgess, O'Donohoe *et al.* 2000; Gowing, Henry-Edwards *et al.* 2002; Carmo, Brulport *et al.* 2006; Clemens, McGregor *et al.* 2007) Os efeitos físicos negativos e passageiros mais comuns são a dilatação da pupila, aumento da tensão nos maxilares, bruxismo (ranger dos dentes), perda de apetite, xerostomia (boca seca), taquicardia e suores frios. Enquanto que os efeitos mais prolongados são insónia, depressão, enxaquecas e rigidez muscular. (Gowing, Henry-Edwards *et al.* 2002) Destacam-se ainda, alguns efeitos crónicos como cardiomiopatia, hipertermia, rabdomiólise, hiponatremia grave, coagulação intravascular disseminada, hepatotoxicidade, nefrotoxicidade e neurotoxicidade. (Burgess, O'Donohoe *et al.* 2000; Kalant 2001)

Encontram-se na literatura alguns trabalhos que sugerem a associação entre problemas oculares com o abuso de diferentes drogas, todas com efeitos simpaticomiméticos sobre o Sistema Nervoso Central (SNC). Essas drogas são a cocaína, a

metanfetamina e a *ecstasy*. (Firth 2006) Resumidamente: Sachs e colaboradores (1993) publicaram um trabalho em que foram identificados 14 pacientes, entre 1 de Julho de 1989 e 30 de Junho de 1991, com problemas na córnea associados à utilização de *crack* (cocaína); mais tarde foram publicados dois estudos independentes por Colatrella e Daniel (1999) e Pilon e Scheiffle (2006), em que identificaram um indivíduo cada (40 e 42 anos) com problemas na córnea e ambos utilizadores de *crack* (cocaína); em 2007 Gosheh e colaboradores encontraram 4 casos, entre Julho de 2006 e Dezembro de 2006, no *Wills Eye Institute* em Filadélfia, USA, em que associaram o consumo de cocaína com o aparecimento de úlceras na córnea; finalmente Pachigolla e colaboradores (2007) investigaram os casos de inflamação da córnea (de origem bacteriana), no *Parkland Memorial Hospital* entre Janeiro de 2000 e Dezembro de 2004. Nestes 5 anos foram identificados 131 pacientes, dos quais 5% eram consumidores regulares de cocaína. (Sachs, Zigelbaum *et al.* 1993; Colatrella and Daniel 1999; Pilon and Scheiffle 2006; Pachigolla, Blomquist *et al.* 2007); relativamente à metanfetamina foram encontrados dois artigos científicos, ambos de 1996, em Poulsen e colaboradores descrevem 4 casos de utilizadores de metanfetamina que apresentam sintomas graves de ulceração da córnea. (Poulsen, Mannis *et al.* 1996) O segundo trabalho é efectuado por Chuck e colaboradores e apresenta um caso de ulceração da córnea em que uma mulher de 31 anos, sem outros problemas de saúde, e consumidora de metanfetamina apresentava ulcerações recorrentes. Sempre que hospitalizada era eficazmente tratada com antibióticos. Foi observado que esta paciente havia tentando várias desintoxicações e que os períodos de doença coincidiam com recaídas, em que voltava a abusar da metanfetamina. (Chuck, Williams *et al.* 1996); quanto à *ecstasy*, foram descritos por O'Neill e colaboradores três casos de complicações oftalmológicas após o consumo de MDMA. (O'Neill and Dart 1993)

Estes trabalhos indicam a potencial ligação entre a utilização de drogas de abuso simpaticomiméticas e a ocorrência de complicações oftalmológicas. No entanto, ainda não foi encontrada uma explicação consensual para esta possível ligação. É de notar que, apesar de poderem advir consequências oftalmológicas sérias da utilização de drogas de abuso, alguns dos efeitos na visão poderão somente ser detectados em situações não ligadas à utilização de drogas ilícitas. Tanto mais que os pacientes poderão não fornecer voluntariamente, informação sobre o consumo de drogas, ou podem não ter relacionado o

problema ocular com o consumo. (Firth 2006) Sendo assim, é possível que os potenciais problemas causados por estas drogas na saúde ocular estejam subestimados.

Apesar da importância das glândulas lacrimais pouco é conhecido sobre a sua expressão proteica. No decorrer desta dissertação será efectuada uma revisão da literatura, destacando-se os trabalhos de proteómica, que nesta área foram efectuados, quase na totalidade directamente nas lágrimas (produto final) e não na expressão proteica da glândula lacrimal ou em algum dos seus constituintes.

É objectivo deste trabalho estudar os efeitos, ao longo do tempo, da *ecstasy* na expressão proteica da glândula lacrimal, após administração aguda de MDMA em ratos e determinar a distribuição da MDMA em diferentes tecidos de rato.

Para a realização do trabalho experimental foram constituídos três grupos com 5 ratos cada. A dois grupos foi administrada uma dose subletal de *ecstasy* intraperitonelamente (grupo MDMA 1h e MDMA 24h). Ao terceiro grupo foi administrada uma solução salina (grupo controlo). Imediatamente após o sacrifício dos animais foram retirados as seguintes amostras: cérebro, coração, pulmão, rim, fígado e glândula lacrimal.

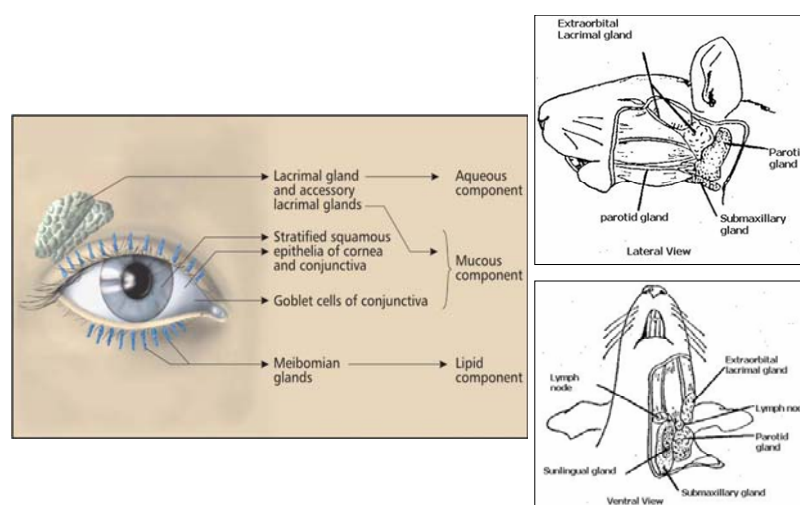
## 1.1. Glândula lacrimal

### 1.1.1. Localização e estrutura

O aparelho lacrimal é constituído pela glândula lacrimal, saco lacrimal, ducto nasolacrimal, canais lacrimais e pelas glândulas de Meibonian. (Paulsen and Berry 2006) Apresentando cada um deles uma função específica, sendo a da glândula lacrimal a de secretar proteínas, água e electrólitos. Os ductos transportam o fluido produzido pelas lacrimais até ao saco lacrimal, que tem a função de armazenar as lágrimas. Os canais lacrimais transportam as lágrimas desde o saco lacrimal até à superfície ocular e o ducto nasolacrimal colecta as lágrimas e transporta-as para a cavidade nasal. Por fim as glândulas de Meibonian têm como principal função a produção de lípidos. (Zoukhri 2006)

A glândula lacrimal é um tecido multilobular composto por ácinos, células miopiteliares e ductos. As células acinares constituem 80% das células desta glândula e são o local de síntese, armazenamento e secreção de proteínas. (Rios, Horikawa et al. 2005; Zoukhri 2006) Esta glândula contribui com electrólitos, água, péptidos, glicoproteínas e proteínas para a camada aquosa do filme lacrimal.

A localização da glândula lacrimal é variável, encontrando-se no homem em posição anterior numa região superior e lateral da órbita (Paulsen and Berry 2006) e no rato, o modelo animal de estudo utilizado nesta dissertação, encontra-se debaixo da pele na face lateral, perto da orelha. (Walcott 1998)



**Figura 1.** Glândula lacrimal em humanos e fonte dos componentes do filme lacrimal, adaptado de Paulsen and Berry, 2006. Localização da glândula lacrimal no rato (retirado de <http://kentsimmons.uwinnipeg.ca/16cm05/16labman05/lb8pg3.htm>).

### **1.1.2. Filme lacrimal**

O filme lacrimal encontra-se na superfície ocular e é constituído pelas camadas aquosa, lipídica e mucosa. O filme lacrimal constitui uma barreira mecânica, e antimicrobiana e assegura uma superfície óptica e refractiva. (Dartt 2004; Paulsen and Berry 2006) Como referido anteriormente, a camada aquosa é essencialmente secretada pela glândula lacrimal. A camada lipídica é secretada pelas glândulas de Meibomian do tarsus e forma a camada superficial do filme lacrimal. A camada mucosa é constituída por mucinas, secretadas pelos tecidos epiteliais das superfícies mucosas, e protegem a superfície ocular funcionando como lubrificante e evitando a aderência bacteriana.

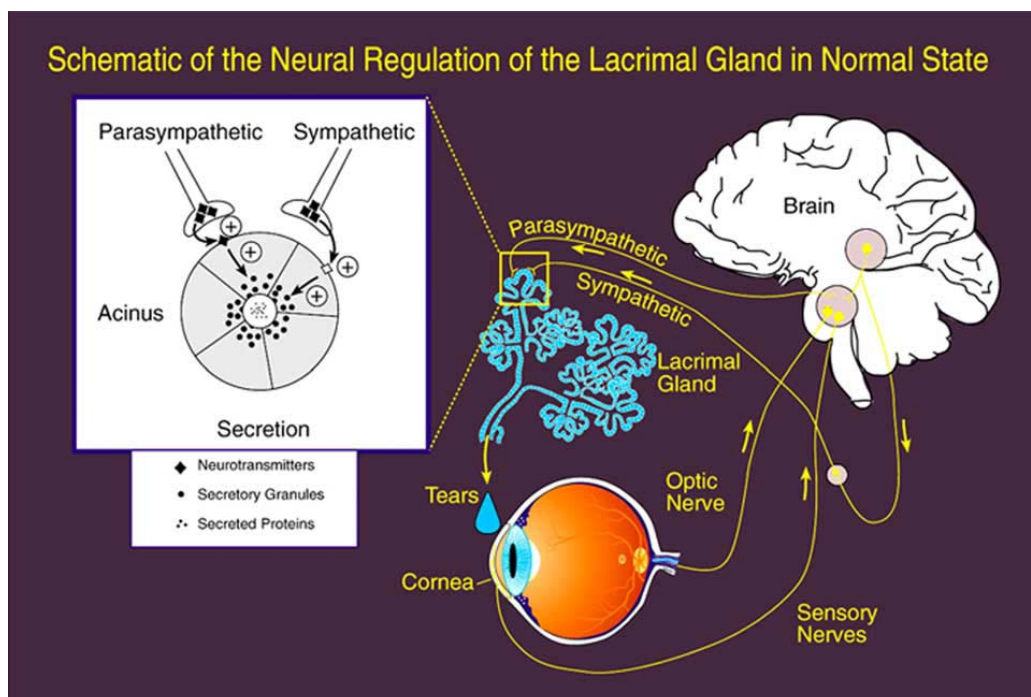
A composição do filme lacrimal deve ser mantida, quantitativamente e qualitativamente, dentro de limites apertados de forma a manter o sistema visual saudável e funcional. Assim, alterações do volume ou constituintes do filme lacrimal, podem levar, rapidamente, a doenças da superfície ocular. (Paulsen, Corfield *et al.* 2003; Oprea, Tiberghien *et al.* 2004; Rios, Horikawa *et al.* 2005; Ohashi, Dogru *et al.* 2006)

Diversos factores fisiológicos podem alterar o equilíbrio dos componentes proteicos presentes no filme lacrimal. (Fung, Morris *et al.* 2004; Li, Wang *et al.* 2005) Este facto levou a um interesse crescente em estudar a composição proteica dos fluidos lacrimais bem como a relação entre essa composição e possíveis variações fisiológicas. (Li, Wang *et al.* 2005)

### **1.1.3. Enervação – Estimulação por via simpática**

A glândula lacrimal é enervada tanto pela divisão simpática como pela parassimpática do Sistema Nervoso Autónomo. (Walcott 1998; Dartt 2001; Hodges, Raddassi *et al.* 2004)

A secreção de proteínas pela glândula lacrimal é estimulada por neurotransmissores e neuropeptídeos libertados pelos neurónios que a enervam. As células acinares possuem receptores para a acetilcolina (muscarínico M3), peptídeo intestinal vasoactivo (VIP) tipo I e II e noradrenalina (adrenérgicos  $\alpha_1$  e  $\beta$ ). (Walcott 1998; Dartt 2001)



**Figura 2.** Esquema da regulação neuronal na glândula lacrimal, adaptado de Zoukhri (2006)

Nas glândulas lacrimais a activação tanto dos nervos simpáticos como dos parassimpáticos induz um aumento na secreção de proteínas. Assim é de questionar o facto, pelo qual, um padrão tão complexo de enervação com vários neurotransmissores e receptores, apresenta como função o aumento de secreção de proteína total. (Dartt, Matkin et al. 1988; Walcott 1998) Uma hipótese é dada por Bromberg e colaboradores (1989) num trabalho com ratos em que a razão entre uma proteína específica (peroxidase) e proteína total é diferente se a estimulação é feita com carbacol (um agonista muscarínico colinérgico) ou propanolol (um agonista  $\beta$ -adrenérgico). Assim uma possibilidade é a de que as células acinares possuem diferentes vias de segregação para diferentes proteínas e que os neurotransmissores actuam de forma diferenciada nestas vias de segregação proteica. (Bromberg, Cripps *et al.* 1989; Anderson, Garrett *et al.* 1995; Walcott 1998) Este facto parece implicar a existência de diferentes grupos secretores de proteínas. A existência de grupos separados de proteínas exocitóticas em ambas as glândulas salivar e pancreática está bem documentada por técnicas bioquímicas e imunohistológicas. (Gorr, Venkatesh et al. 2005) É de supor que o mesmo também aconteça com a glândula lacrimal. (Bromberg, Cripps *et al.* 1989; Anderson, Garrett *et al.* 1995; Walcott 1998)

Segundo Ding e colaboradores (2003) a resposta robusta dada pela noradrenalina e fenilefrina sugere que a enervação simpática da glândula lacrimal de rato, tem uma

significância funcional superior à previamente suposta. A resposta significativa de fragmentos da lacrimal a agonistas adrenérgicos sugere um controlo adrenérgico, directo e extenso das células acinares. A complexidade do padrão de enervação da glândula lacrimal, conjuntamente com os múltiplos neurotransmissores e moduladores presentes, podem influenciar a composição das lágrimas. (Ding, Walcott *et al.* 2003) Baseado nos resultados obtidos em trabalhos realizados em coelho, Bromberg sugeriu que os sistemas simpático e parassimpático trabalham em conjunto de forma a que a secreção das lágrimas seja feita com a composição apropriada. O sistema parassimpático parece regular, principalmente o fluxo e a composição de electrólitos e o sistema simpático poderá regular a secreção de proteínas. (Bromberg 1981) Assim, podem ser produzidas lágrimas com composições diferentes, resultantes de estimulação diferencial parassimpática ou simpática, dependendo da necessidade de uma dada situação. (Ding, Walcott *et al.* 2003)

#### **1.1.4. Composição do fluido lacrimal**

A osmolaridade do fluido lacrimal é de cerca de 300 mOsm e possui  $\text{Na}^+$  (128,7 mM),  $\text{K}^+$  (17 mM),  $\text{Cl}^-$  (141,3 mM) e  $\text{HCO}_3^-$  (12,4 mM). Este fluido apresenta uma osmolaridade próxima da do plasma, apresentando, no entanto menos sódio (140 mM no plasma), mais potássio (4 mM no plasma) e muito mais cloreto (100 mM no plasma). (Walcott 1998) Um dos principais “produtos” de secreção da lacrimal é a água. Esta move-se do espaço intersticial da glândula para o lúmen, onde se mistura com outros produtos de secreção. Este movimento de água acontece por osmose, que, por sua vez, depende do movimento de partículas (iões) das células acinares para o lúmen. (Walcott 1998) Tal como nas glândulas salivares, a glândula lacrimal apresenta diferenças entre as células acinares, que produzem o fluido lacrimal e as células do ducto que modificam a composição iónica do fluido por retenção de  $\text{Na}^+$ . (Walcott 1998)

Cerca de 20-40% do total de proteínas nas lágrimas é constituído por lisozima, sendo esta a proteína mais alcalina. A concentração de lisozima é suficientemente alta para apresentar actividade antibacteriana. Outras das principais proteínas associadas à glândula lacrimal são a lactoferrina, o factor de crescimento epidérmico (EGF) e a lipocalina. A lactoferrina possui funções antibacterianas e pode actuar com sequestrador de radicais

livres. O EGF tem um papel regulador na manutenção da superfície ocular, controlo de cicatrização e em doenças da superfície ocular. A lipocalina é uma proteína ácida, que deverá contribuir para a alta viscosidade do filme lacrimal e a sua baixa tensão superficial, factores que são essenciais para a estabilidade do filme lacrimal. (Johnson and Murphy 2004; Ohashi, Dogru *et al.* 2006)

**Tabela 1.** Principais componentes proteicos das lágrimas humanas, adaptado de Ohashi *et al.* (2005).

<b>Proteínas identificadas</b>	<b>Referência</b>
(1) Albumina: Proteína da glândula Von Ebner's (prealbumina lacrimal), albumina soro	(Sapse, Bonavida <i>et al.</i> 1969; Li, Wang <i>et al.</i> 2005)
(De La Garza, Fabrizio <i>et al.</i> ) Transferrina: serotransferrina prec.	(Aisen and Leibman 1972; Li, Wang <i>et al.</i> 2005)
(3) Lisozima: lisozima C prec. (EC 3.2.1.17) (1,4-beta- <i>N</i> -acetilmuramidase C), contribuição do efeito hidrofóbico para a estabilidade conformacional da lisozima humana.	(Mackie and Seal 1976; Avisar, Menache <i>et al.</i> 1979; Farris 1985; Li, Wang <i>et al.</i> 2005)
(4) Ig: IgA, IgG, IgM, Ig cadeia alfa-1 região C, Ig cadeia alfa-2 região C, Ig cadeia lambda região C, Ig cadeia kappa região C, Ig cadeia pesada V-III região BRO/or TEI, imunoglobulina cadeia J, Ig cadeia pesada V-I região SIE, Ig cadeia mu região C, Ig cadeia pesada região variável, receptor imunoglobulina polimérica prec. (Poly-Ig receptor) (PIGR)	(Heremans 1968; McClellan, Whitney <i>et al.</i> 1973; Li, Wang <i>et al.</i> 2005)
(5) Cistatina: cistatina SN prec. (cistatina salivar SA-1), cistatina S prec. (proteína-1 ácida salivar) (Cistatina SA-III), cistatina SA prec. (cistatina S5), cistatina D prec., cistatina C prec. (polipeptídeo básico neuroendocrino)	(Reitz, Breipohl <i>et al.</i> 1998; Li, Wang <i>et al.</i> 2005)
(6) Proteína rica em Prolina: proteína 1 rica em prolina, prec. proteína 3 rica em prolina, proteína 4 rica em prolina, carcinoma nasofaríngeo associado proteína 4 rica em prolina, proteína 5 rica em prolina prec. (proteína rica em prolina PBI)	(Li, Wang <i>et al.</i> 2005)
(7) Lactoferrina	(Gillette and Allansmith 1980; Ohashi, Ishida <i>et al.</i> 2003)
(8) Lipocalina	(Redl, Holzfeind <i>et al.</i> 1992; Schoenwald, Vidvauns <i>et al.</i> 1998)



<b>Proteínas identificadas</b>	<b>Referência</b>
(9) Factor de crescimento epidérmico (EGF)	(van Setten, Tervo <i>et al.</i> 1991; Wilson 1991; Pflugfelder, Jones <i>et al.</i> 1999; Ohashi, Ishida <i>et al.</i> 2003)
(10) Aquaporina 5	(Ohashi, Ishida <i>et al.</i> 2003)
(11) $\alpha$ -Defensina	(Hida, Ohashi <i>et al.</i> 2005)
(12) Proteína indutível Prolactina	(Li, Wang <i>et al.</i> 2005)
(13) Mamaglobina B	(Li, Wang <i>et al.</i> 2005)
(14) Fosfolipase A, associada à membrana	(Li, Wang <i>et al.</i> 2005)
(15) Extracelular glicoproteína lacritina prec.	(Li, Wang <i>et al.</i> 2005)
(16) Lipofilina A prec. (família 1D secretoglobina membro 1)	(Li, Wang <i>et al.</i> 2005)
(17) Beta-2-microglobulina prec. (HDCMA22P)	(Li, Wang <i>et al.</i> 2005)
(18) Antileucoproteínase 1 prec. (ALP)	(Li, Wang <i>et al.</i> 2005)
(19) Inibidor 3 angiogénese cérebro-específico prec.	(Li, Wang <i>et al.</i> 2005)
(20) Aminopeptidase aspartil (EC 3.4.11.21)	(Li, Wang <i>et al.</i> 2005)
(21) Factor-1 sequência rica em G (GRSF-1)	(Li, Wang <i>et al.</i> 2005)
(22) Proteína cinase activada 5'-AMP, cadeia catalítica alfa-2 (EC 2.7.1.) (AMPK cadeia alfa-2)	(Li, Wang <i>et al.</i> 2005)
(23) Proteína 1 regulada por oxigénio	(Li, Wang <i>et al.</i> 2005)
(24) Clatrina prec. (Proteína SP-40,40, associada ao complemento)	(Li, Wang <i>et al.</i> 2005)
(25) Mesotelin prec. (CAK1 antígeno)	(Li, Wang <i>et al.</i> 2005)
(26) Factor transcrição endotelial GATA-2	(Li, Wang <i>et al.</i> 2005)
(27) Factor 1 export RNA nuclear (proteína associada Tip)	(Li, Wang <i>et al.</i> 2005)
(28) Proteína 1 rica em Leucina resposta primária (proteína resposta primária hormona estimulante folículo)	(Li, Wang <i>et al.</i> 2005)
(29) Proteína ribossomal 60S L18a	(Li, Wang <i>et al.</i> 2005)

Proteínas identificadas	Referência
(30) Proteína transmembranar rica em leucina FLRT3 prec.	(Li, Wang <i>et al.</i> 2005)
(31) Proteína 2 canal intracelular cloreto (XAP121)	(Li, Wang <i>et al.</i> 2005)
(32) Proteína 4 alelo M salivar básica rica em prolina	(Li, Wang <i>et al.</i> 2005)
(33) <i>Deleted in malignant brain tumors 1 isoform a prec.</i>	(Li, Wang <i>et al.</i> 2005)
(34) KFLA590	(Li, Wang <i>et al.</i> 2005)
(35) Proteína hipotética	(Li, Wang <i>et al.</i> 2005)
(36) Semelhante a proteína 1 salivar	(Li, Wang <i>et al.</i> 2005)
(37) Proteína transferência fosfolípidos prec.	(Li, Wang <i>et al.</i> 2005)
(38) Proteína hipotética	(Li, Wang <i>et al.</i> 2005)

#### 1.1.5. Análise proteômica do fluido lacrimal

A análise proteômica do fluido lacrimal é de interesse fundamental em investigação na área da oftalmologia. A proteômica deverá dar uma ajuda fundamental na identificação das proteínas das lágrimas, o que contribuirá para a compreensão das doenças do olho, no diagnóstico clínico e na avaliação da influência da medicação na estrutura, composição e secreção de proteínas das lágrimas. (Zhou, Beuerman *et al.* 2006)

A electroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) foi utilizada durante vários anos na análise de proteínas em lágrimas, apresentando dificuldades na identificação de novas proteínas devido às limitações da técnica. (Dartt, Matkin *et al.* 1988; Kuizenga, van Haeringen *et al.* 1996; Reitz, Breipohl *et al.* 1998; Grus, Sabuncuo *et al.* 2002)

Mais recentemente técnicas como o HPLC e electroforese em gel de duas dimensões (2DE), também foram utilizadas na identificação de proteínas em lágrimas. A 2DE revelou ser uma técnica com boa reprodutibilidade e sensibilidade suficiente para a separação e análise de múltiplas proteínas, mas com a desvantagem de ser uma técnica trabalhosa, demorada e com necessidade de quantidades elevadas de amostra. (Ohashi, Dogru *et al.* 2006)

Nos últimos anos têm sido desenvolvidos vários esforços na tentativa de aplicar técnicas de espectrometria de massa na caracterização do proteoma lacrimal. Isto inclui análise directa por MALDI/TOF/MS, 2DE seguido de MALDI/TOF/MS, *shotgun* seguido de LC-MS/MS, SELDI/TOF/MS, HPLC-ESI/MS, e RP-HPLC com recolha de fracções, seguida de digestão com tripsina e análise dos digestos por nanoLC-ESI/MS/MS. (Zhou, Beuerman *et al.* 2006)

Zhou e colaboradores (2006) analisaram 80 µl de lágrimas de 6 pacientes com pterígio, por HPLC de fase reversa. Foram colectadas um total de 21 picos/fracções. Cada fracção foi, seguidamente, concentrada e digerida com tripsina durante 2 horas a 37°C e analisada por nanoLC-ESI/MS/MS. No total foram identificadas 60 proteínas diferentes, 51 com base em 2 ou mais peptídeos diferentes e as restantes apenas com um. Para além de algumas proteínas abundantes e bem conhecidas das lágrimas (lisozima, lactoferrina, lipocalina, albumina do soro) este estudo revelou diversas formas de proteínas ricas em prolina (PRPs) no fluido lacrimal. Foi observada um total de 5 PRP's – lacrimal rica em prolina 4, proteína rica em prolina 5, proteína 4 rica em prolina associada ao carcinoma nasofaríngeo, proteína 3 rica em prolina, proteína básica rica em prolina. Sendo que a PRP 5 foi encontrada nas lágrimas pela primeira vez.

Grus e colaboradores (2005) compararam as lágrimas recolhidas em 88 pacientes com Síndrome de Olho Seco (DES) e de 71 indivíduos saudáveis, utilizando SELDI-TOF/MS *ProteinChip* com três superfícies cromatográficas diferentes (CM10 de troca catiónica, Q10 de troca aniónica e H50 de fase reversa) e laser com duas energias diferentes. A análise dos espectros obtidos por SELDI-TOF/MS confirmou que a quantidade de lisozima nas lágrimas de pacientes com olho seco se encontra reduzida relativamente aos indivíduos normais. Foram detectados mais de 1000 picos por amostra, de entre todas as condições experimentadas, revelando um complexo padrão de peptídeos. No grupo com DES foram determinados sete potenciais biomarcadores, com a ajuda de análise multivariável discriminante. Utilizando estes sete biomarcadores foi possível separar os dois grupos com uma sensibilidade e especificidade de aproximadamente 90%. Dois dos biomarcadores foram identificados como pertencentes à família das PRPs (PRP3 e PRP4). Outros três foram identificados como uma variante da PRP4 (NCAPP4), Calgranulina A e um fragmento C-terminal de  $\alpha$ 1-antitripsina. Os restantes dois biomarcadores de 3700 e 3916 Da ainda não foram identificados. (Grus, Podust *et al.* 2005)

Li e colaboradores (2005) utilizaram um total de 4 µl de lágrimas para a análise por SDS-PAGE seguido de digestão em gel e MALDI/MS e por LC-ESI/MS e LC-MALDI/MS/MS. Foi detectada um total de 54 proteínas (resumidas na tabela 1 por Ohasi e colaboradores em 2006) e destas, 44 podem ser detectadas por LC-MALDI/MS/MS utilizando apenas 2 µl de lágrimas.

Tomosugi e colaboradores (2005) analisaram por SELDI-TOF/MS, utilizando placas CM10, as lágrimas provenientes de dois grupos, um com 31 pacientes com Síndrome de Sjögren (SS), dos quais 23 com SS primário (p-SS) e 8 com SS secundário (s-SS), o outro com 57 sujeitos controlo, dos quais 14 com DES, 22 com diferentes doenças oculares e 21 voluntários saudáveis. Neste estudo foram considerados 10 picos como potenciais biomarcadores, sendo separados em dois grupos: um constituído por sete picos com razão massa-carga ( $m/z$ ) de 2094, 2743, 14191, 14702, 16429, 17453, 17792 que se encontra sub-expresso nas lágrimas de pacientes com SS primário. O outro grupo apresenta três picos com  $m/z$  de 3483, 4972, 10860 que se encontrava sobre-expresso no grupo p-SS. Não foram encontradas diferenças significativas entre o grupo p-SS e s-SS.

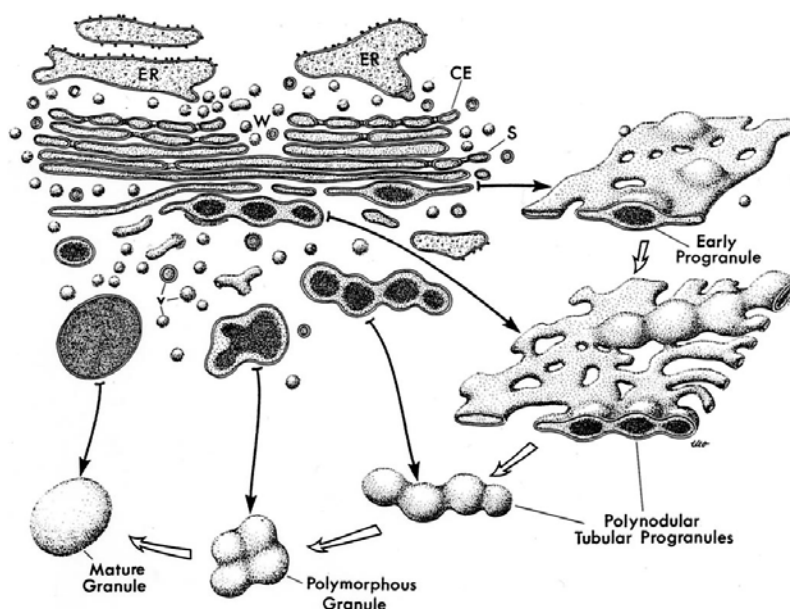
Zhou e colaboradores (2003) analisou proteínas de lágrimas de coelho por RP-HPLC-ESI/MS, sendo as proteínas separadas em 17 picos e determinados os componentes proteicos mais abundantes das lágrimas como a lactoferrina, lisozima (em quantidades baixas), albumina, lipocalina, lipofilina e  $\beta$ 2-microglobulina. (Zhou, Beuerman et al. 2003)

#### **1.1.6. Grânulos Secretores**

Em todas as células eucarióticas existem transportadores vesiculares entre o complexo de Golgi e a superfície celular para exportar os productos secretórios e a entrega de componentes para a membrana plasmática. Os grânulos secretores (SGs) são organelos esféricos delimitados por membranas com diâmetros de algumas centenas de nanómetros. (Stephens and Pepperkok 2001) A presença de SGs reflecte a capacidade de algumas células de dedicar, pelo menos parte deste sistema de transporte à concentração e armazenamento intracelular dos produtos de secreção, para mobilização e descarga intermitente em relação a estímulos externos. (Cameron, Cameron *et al.* 1986; Castle and Castle 1993)

Aquando da formação dos SGs na rede trans do Golgi (TGN), estes são ainda imaturos. As proteínas destinadas à secreção, entram na via secretória no retículo endoplasmático e movem-se através do complexo de Golgi para a TGN, onde são separadas e transportadas para o seu destino final. (Castle and Castle 1993; Stephens and Pepperkok 2001) O processamento progressivo e empacotamento de proteínas levam a um aumento de condensação dos SGs e a sua conversão em SGs maduros. Os grânulos são facilmente distinguíveis dos outros organelos pela sua aparência morfológica, por microscopia electrónica de transmissão. No entanto os SGs apresentam uma população bastante heterogénea, mesmo dentro da mesma célula. Por exemplo eles podem variar em tamanho e na cinética de libertação do seu conteúdo. A célula ajusta a biossíntese de SGs não só em resposta a estímulos, como também em relação à depleção de grânulos. Tendo sido obtidas evidências de mecanismos de *feedback* que promovem a transcrição de genes secretores após a exocitose de SGs em *Tetrahymena thermophila*. (Borgonovo, Ouwendijk *et al.* 2006)

Relativamente às células acinares da glândula lacrimal, estas segregam os conteúdos dos grânulos maduros, que contêm proteínas que vão participar na constituição das lágrimas, em resposta a secretagogos. (Jerdeva, Wu *et al.* 2005)



**Figura 3.** Aparelho de Golgi de um lactotrofo de rato, adaptado de Dannies (1999).

## 1.2. Drogas simpaticomiméticas

A produção de lágrimas pode ser afectada por medicação tópica ou sistémica. Fármacos comuns que diminuem a produção aquosa incluem diuréticos e os que apresentam efeitos anti-muscarínicos, como os anti-histamínicos, anti-depressivos e ansiolíticos. (Johnson and Murphy 2004)

Barger and Dale (1910) sugeriram que compostos activos deveriam ser chamados de simpaticomiméticos de forma a indicar a relação entre a sua acção e a enervação pelo sistema simpático, sem envolver qualquer preconceito teórico sobre o significado dessa relação ou o mecanismo preciso de acção. O potencial simpaticomimético foi classificado segundo o efeito na tensão sanguínea. No mesmo trabalho identificaram como compostos simpaticomiméticos: b-feniletilamina, e os isómeros, b-metilfeniletilamina, fenilpropilamina. (Barger and Dale 1910; Burn and Rand 1958) Mais tarde Burn e Rand definiram como simpaticomiméticos de acção directa aqueles que provocam contracção membranar após desnervação simpática pós-gangliónica (e que não era bloqueada por reserpina), em contraste com os compostos que requerem enervação para produzir contracção membranar e apresentam respostas sensíveis à reserpina. (Fleckenstein and Burn 1953; Burn and Rand 1958; Sulzer, Sonders *et al.* 2005) Todos os simpaticomiméticos são bases fracas com grupos amina capazes de aceitar protões e com pKs entre 8 e 10. (Sulzer, Sonders *et al.* 2005)

A MDMA, à semelhança das restantes anfetaminas, é um composto simpaticomimético de acção indirecta. (Sulzer, Sonders *et al.* 2005) A sua acção ocorre por libertação dos neurotransmissores simpáticos das vesículas dos terminais nervosos e da medula supra-renal, nomeadamente da serotonina (5-hidroxitriptamina; 5-HT) e das catecolaminas noradrenalina, adrenalina e dopamina. As aminas libertadas activam os respectivos receptores levando a um estado de estimulação simpática com intensidade e duração proporcional à dose e via de administração.

Na tabela 3 são descritas manifestações orais em utilizadores de MDMA. (Brazier, Dhariwal *et al.* 2003) Esta tabela é apresentada com o intuito de salientar a acção da *ecstasy* sobre as glândulas salivares, provocando xerostomia ou boca seca, o que se deve à diminuição da produção de saliva.

**Tabela 2.** Manifestações orais em utilizadores de 3,4-metilenedioximetanfetamina, adaptado de Brazier, Dhariwal *et al.*, 2003.

• Bruxismo
• Ranger dos dentes
• Atrito dentário
• <b>Xerostomia</b>
• Ulceração da mucosa
• Periodontite

### 1.3. 3,4-Metilenodioximetanfetamina (MDMA)

#### 1.3.1. Aspectos históricos

*Ecstasy* é o nome popular para uma substância identificada quimicamente como 3,4-metilenodioximetanfetamina. As letras iniciais das principais partes do nome químico (MetilenoDioxiMetAnfetamina) deram origem ao acrónimo MDMA. (Kalant 2001)

A MDMA foi primeiro sintetizada e patenteada pela Merck em 1914 (Ortuno, Pizarro *et al.* 1999; Christophersen 2000; Skrinska and Gock 2005), com a finalidade de ser utilizada para o controlo do apetite. No entanto, a patente expirou devido à falta de interesse comercial, levando a que a MDMA nunca ficasse disponível comercialmente. O composto manteve-se relativamente ignorado até ao início dos anos 50 em que foi utilizado em diversos estudos toxicológicos em animais. Em 1968 apareceram as primeiras utilizações não médicas. Por volta de 1980, começou a ser utilizado legalmente, em pequenas doses, como coadjuvante de psicoterapia. A meio dos anos oitenta, um número elevado de laboratórios clandestinos providenciaram a distribuição da MDMA no mercado americano. Nesta altura a distribuição europeia estava no seu estado primordial. (Christophersen 2000; Kalant 2001; Skrinska and Gock 2005)

Devido ao potencial de adição e aos extensos relatórios de má utilização e overdose, o DEA (Drug Enforcement Administration) dos Estados Unidos da América colocou a MDMA na lista de substâncias psicotrópicas, sob controlo internacional, *schedule I*. (Christophersen 2000; Kalant 2001)

Os efeitos estimulantes da anfetamina sempre foram populares, mas os seus derivados metilenedióxido, chamados de *designer drugs*, como a MDMA, são ainda mais potentes. Estas drogas aumentam o estado de alerta, a confiança e a energia e produzem sentimentos de euforia. (Kintz and Samyn 1999; Maurer, Bickeboeller-Friedrich *et al.* 2000; McCooeye, Mester *et al.* 2002; Pujadas, Pichini *et al.* 2003) Assim estas drogas, potentes estimulantes do sistema nervoso central, possuem grande procura, principalmente entre os jovens. Verificando-se que, na última década, muitos países registaram uma difusão crescente do consumo de derivados de anfetamina. (Mancinelli, Gentili *et al.* 1999; Burgess, O'Donohoe *et al.* 2000)



A MDMA tornou-se popular principalmente entre participantes de *raves* porque provocam um aumento de energia, da resistência, sociabilização e também, como referido anteriormente, há uma ideia generalizada de que se trata de uma droga segura. Hoje sabe-se que causa sérios efeitos tóxicos, agudos e crónicos, que são essencialmente provocados por um excesso dos efeitos simpaticomiméticos. (Kalant 2001) Foram identificados diversos problemas associados com a *ecstasy* como toxicidade hepática, neurotoxicidade, psicopatologias, potencial de abuso e até morte. (McCooye, Mester *et al.* 2002; Pujadas, Pichini *et al.* 2003) A popularidade destas drogas, e as consequências potencialmente perigosas que advêm da sua utilização levam à necessidade da sua rápida análise quantitativa em fluidos biológicos, tanto em laboratórios clínicos como forenses, (Kintz and Samyn 1999; McCooye, Mester *et al.* 2002) de modo a conhecer a realidade e a causa da intoxicação e também para avaliar o nível de incapacidade causado pela droga. (Kintz and Samyn 1999)

### **1.3.2. Farmacocinética**

Tal como as anfetaminas, a MDMA e outros compostos relacionados são aminas que podem existir sobre a forma de bases livres ou sais de diferentes ácidos.

A MDMA é quase sempre tomada por via oral e é preparada em pastilhas de toma única para esta finalidade. A actual composição das pastilhas varia bastante, tanto relativamente à(s) droga(s) contidas como à quantidade. Diferentes laboratórios analisaram amostras vendidas nas ruas, nas suas localidades e descobriram que a droga vendida como *ecstasy* podia ser: MDMA, MDEA, MDA, PMA, MBDB, efedrina ou várias misturas destas drogas. No entanto, a maioria consistia de apenas uma droga activa. A dose típica de MDMA varia entre 50 e 150 mg. A dosagem comum entre utilizadores é de 1 a 2 pastilhas por noite, mas, ocasionalmente, surgem relatos de indivíduos que tomaram até 10 pastilhas.

Os efeitos da *ecstasy* aparecem entre 20 a 60 minutos após o seu consumo, prolongando-se entre 4 a 6 horas. Esta droga é prontamente absorvida através do tracto intestinal e alcança a sua concentração máxima no plasma cerca de 2 horas após a administração oral. A eliminação do MDMA do corpo é relativamente lenta, sendo o seu

tempo de semi-vida de 7 a 8 horas. Cerca de 65% da dose é eliminada inalterada pela urina. (Garcia-Repetto, Moreno *et al.* 2003; Libiseller, Pavlic *et al.* 2005; Maxwell 2005)

Doses de 50, 75 e 125 mg administradas a indivíduos voluntários saudáveis produziram picos de concentração sanguínea de 106, 131 e 236 ng/ml respectivamente. Estas concentrações são bastante baixas porque a droga passa rapidamente para os tecidos. (Kalant 2001)

A MDMA é metabolizada principalmente no fígado, sendo a principal responsável a enzima CYP2D6. No entanto, várias enzimas diferentes estão envolvidas na degradação da *ecstasy*, e algumas destas aparentam saturar com baixas concentrações da droga. (Kalant 2001; Carmo, Brulport *et al.* 2006) Consequentemente à medida que a dose da droga aumenta e que as enzimas de maior afinidade estão saturadas, verificam-se, desproporcionalmente maiores concentrações da droga no sangue e em diferentes órgãos. Assim, a pequenos aumentos na dosagem ocorre o risco de um aumento da toxicidade.

A meia-vida da MDMA no sangue é de cerca de 8 horas. Logo, leva cerca de 5 meias-vidas (40 horas) para que mais de 95% da droga seja eliminada do corpo. A lenta eliminação da MDMA do organismo poderá explicar a persistência de problemas por um ou dois dias após o consumo. (Kalant 2001) Também alguns dos metabolitos da MDMA são farmacologicamente activos, nomeadamente o MDA, N-Me- $\alpha$ -MeDA e  $\alpha$ -MeDA, (Kalant 2001; Carvalho, Remiao *et al.* 2004) podendo a duração da acção ser superior à duração da MDMA no corpo. (Kalant 2001)

Não existem ainda dados sobre a percentagem de ligação às proteínas plasmáticas humanas. Por outro lado, são ainda escassos os dados sobre a distribuição da MDMA nos tecidos humanos. (Rohrig and Prouty 1992) É, no entanto, importante salientar que relativamente à MDMA os estudos realizados até ao momento permitiram encontrar concentrações de MDMA em alguns órgãos ou tecidos, em particular no fígado, cérebro e pulmões, que chegam a ser cerca de 18 vezes superiores às plasmáticas. (Chu, Kumagai *et al.* 1996; Garcia-Repetto, Moreno *et al.* 2003)

### 1.3.3. Acção farmacológica

A MDMA possui grande afinidade pelos receptores e transportadores de serotonina no cérebro. Os neurónios produtores de serotonina regulam a agressividade, o comportamento, a actividade sexual, o sono e a sensibilidade à dor. A serotonina é também importante na memória e na regulação da temperatura. Quando administrada, a *ecstasy* inicialmente aumenta no cérebro a concentração extracelular de serotonina, o que poderá levar à depleção deste neurotransmissor. Adicionalmente, a MDMA induz um rápido e substancial aumento de outro neurotransmissor, a dopamina, que tem um papel importante no controlo dos movimentos, compreensão e na motivação e recompensa. (Gowing, Henry-Edwards *et al.* 2002) Por fim, a MDMA provoca, também, a libertação de noradrenalina.

A libertação de serotonina e possivelmente dopamina é o principal mecanismo de acção subjacente aos efeitos sobre o Sistema Nervoso Central da *ecstasy*. Enquanto que a libertação de noradrenalina é o principal responsável pelos efeitos sobre o Sistema Nervoso Periférico, que a MDMA partilha com a anfetamina. (Kalant 2001)

### 1.3.4. Métodos de análise da 3,4-metilenodioximetanfetamina

O rápido aumento do abuso de derivados de anfetaminas ilegais nas últimas décadas levou à necessidade cada vez maior de desenvolver métodos sensíveis, selectivos e rápidos para a identificação e quantificação de MDMA, MDA e MDEA em fluidos biológicos como o plasma, a urina e a saliva.

Actualmente, a estratégia analítica geral para a detecção de drogas de abuso envolve um processo com dois passos. Primeiro é utilizada uma técnica de rastreio de forma a separar as amostras entre presumíveis negativas e positivas. E uma segunda técnica com fins confirmatórios. Normalmente a técnica de rastreio baseia-se em ensaios imunológicos e a técnica para confirmação baseia-se numa propriedade diferente do analito e deve ser no mínimo tão sensível como o procedimento de rastreio. Habitualmente envolve a utilização de cromatografia líquida ou gasosa (que é a mais comum), com detecção por espectrometria de massa ou por espectrofotometria. (Bogusz 1999; Butler and Guilbault 2004; Maurer 2004)

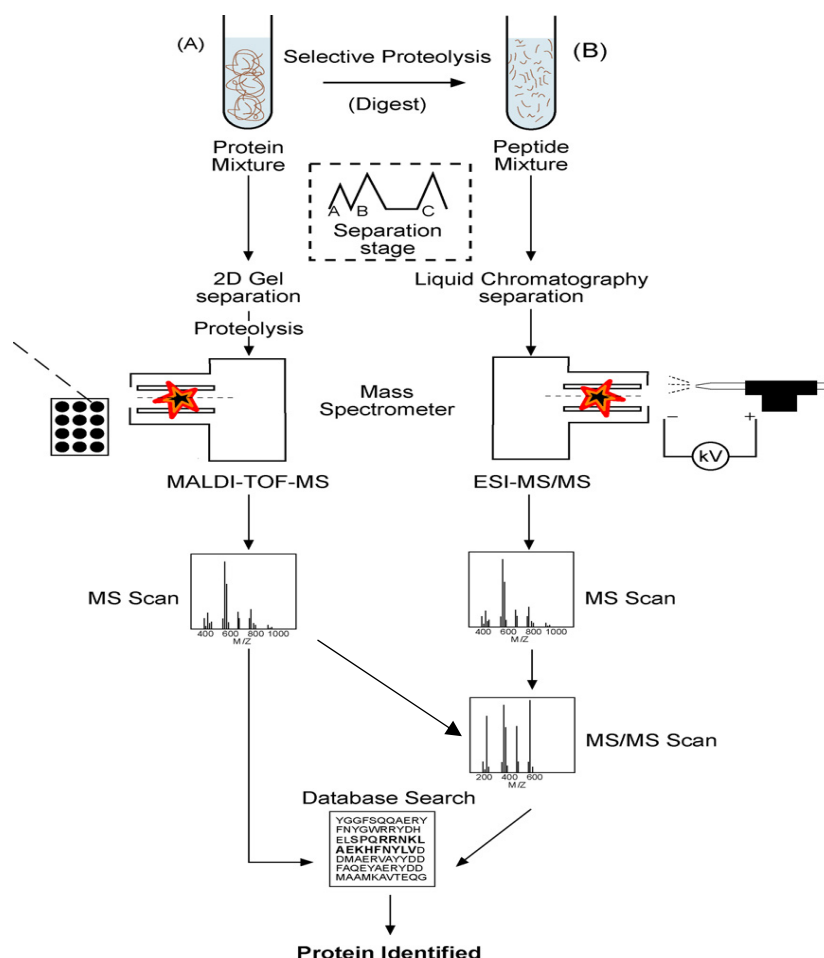
Com poucas excepções, as técnicas cromatográficas requerem algum tipo de procedimento para separarem as drogas da matriz da amostra. Estes procedimentos podem ser separados em 3 tipos distintos: Extracção Líquido-Líquido (LLE), Extracção em Fase Sólida (Redl, Holzfeind *et al.*), Micro-Extracção em Fase Sólida (SPME). (Drummer 1999) Assim, a preparação da amostra é um requisito importante para a identificação dos derivados de anfetamina em matrizes biológicas. Este processo envolve o isolamento e se necessário a quebra dos conjugados na urina e/ou a derivatização do analito. O isolamento normalmente processa-se por LLE, a pH alcalino, no qual estas substâncias não estão ionizadas. Mais recentemente têm sido também utilizadas técnicas de extracção em fase sólida como SPE e SPME, para análise de MDMA em urina e saliva. Frequentemente é necessário derivatizar a amostra de forma a melhorar as propriedades cromatográficas e de detecção. Apesar da necessidade de procedimentos complexos e demorados, os métodos cromatográficos continuam a ser a técnica preferencial para confirmação de amostras com *ecstasy*. (Butler and Guilbault 2004; Skrinska and Gock 2005)

A HPLC é um método bastante versátil que tem sido utilizado preferencialmente com os seguintes métodos de detecção: ultravioleta (Jones, Duvauchelle *et al.*) (Jones, Duvauchelle *et al.* 2005), electroquímico (EC), fluorescência (FL) e espectrometria de massa (MS). Aos métodos de HPLC-UV e -FL é muitas vezes associado um procedimento de derivatização. A utilização de LC-MS é mais simples de adaptar a determinações sensíveis de vários tipos de drogas, incluindo as anfetaminas. Uma vantagem importante de LC-MS relativamente a GC-MS, é que não necessita de derivatização, permitindo assim reduzir o tempo de análise. (Pichini, Pacifici *et al.* 2004; Maurer 2005; Nakashima 2005) No entanto LC-MS apresenta algumas limitações, principalmente durante o processo de ionização. É importante lembrar que os espectros obtidos por ionização por electrospray e por ionização química a pressão atmosférica são mais difíceis de comparar entre aparelhos de diferentes laboratórios do que os espectros obtidos por ionização por impacto electrónico em GC-MS. (Maurer 2005)

Têm sido efectuadas determinações de derivados de anfetamina utilizando cromatografia gasosa acoplada com diferentes sistemas de detecção como MS, ECD, NPD e FID. Mas não há duvidas que a GC acoplada directamente a um sistema de detecção MS é ainda a técnica mais poderosa para identificação e quantificação de anfetaminas. (Mitrevski and Zdravkovski 2005)

## 1.4. Técnicas de análise em proteómica

Não existe nenhum método capaz de identificar e quantificar os componentes de uma amostra complexa de proteínas num único passo. Têm de ser utilizados em conjunto diferentes componentes para separar, identificar e quantificar os polipeptídeos, bem como ferramentas para integrar e analisar todos os dados. Assim, podem ser identificadas duas vias principais para a identificação de proteínas em amostras complexas. A primeira e mais utilizada é uma combinação entre electroforese bidimensional em gel de poliácridamida (2DE-PAGE) e espectrometria de massa (MS). A segunda via combina a purificação de proteínas (ex. cromatografia líquida) com as mais recentes técnicas de análise de peptídeos por MS/MS. Em cada um dos casos são necessárias infraestruturas potentes para armazenamento, processamento e visualização de dados. (Aebersold and Mann 2003; Amado, Vitorino *et al.* 2005; Kicman, Parkin *et al.* 2007) Na figura 4 é apresentado um esquema ilustrativo destas duas vias principais.

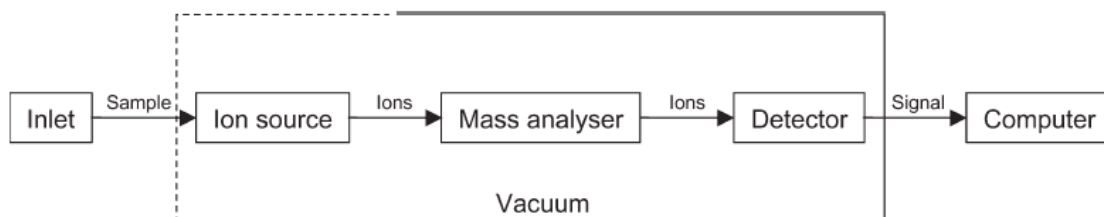


**Figura 4.** Esquema ilustrativo de análise em proteómica, adaptado de Kicman *et al* (2007).

### 1.4.1. Espectrometria de massa em proteómica

É de salientar o papel da espectrometria de massa em todo este processo. Em espectrometria de massa os iões em fase gasosa são separados em função da sua razão massa/carga ( $m/z$ ), com elevada sensibilidade. Nos últimos 20 anos, esta técnica tem vindo a ter um papel cada vez mais importante nas ciências biológicas, e actualmente é o método mais sensível para a caracterização estrutural de biomoléculas. O sucesso da espectrometria de massa em biologia deve-se em grande parte ao aparecimento de técnicas de ionização suave como o electrospray (Fenn, Mann *et al.* 1989; Resing and Ahn 2005) e ionização por desorção por laser assistida pela matriz (MALDI), que permitem a transferência para a fase gasosa de moléculas grandes, polares e termicamente lábeis, permitindo determinar a sua massa sem derivatização prévia. (Karas and Hillenkamp 1988; Lane 2005)

Actualmente todos os espectrómetros de massa são constituídos por: uma fonte iónica, para produzir iões a partir da amostra; um ou mais analisadores de iões, para separar os iões de acordo com a sua razão  $m/z$ ; o detector, para registar o número de iões que provêm do analisador; um computador, para processar os dados, produzir os espectros de massa e controlar o aparelho. (Guerrera and Kleiner 2005; Lane 2005)



**Figura 5.** Esquema representativo de um espectrómetro de massa, adaptado de Lane (2005).

#### 1.4.1.1. Fonte Iónica

Para analisar uma amostra por MS, esta deve ser primeiro vaporizada e ionizada. Sendo as duas técnicas de ionização mais utilizadas para a análise de proteínas e peptídeos a ESI e a MALDI. A ionização por electrospray produz iões a partir de amostras em fase líquida. Por isso, pode facilmente, ser acoplada a técnicas de separação baseada em soluções como cromatografia líquida e electroforese capilar, sendo utilizada

preferencialmente para análise de amostras complexas. Enquanto que, a MALDI ioniza amostras a partir de uma matriz seca e cristalina e é normalmente utilizada para amostras simples de misturas de peptídeos. (Lane 2005)

#### **1.4.1.2. Analisadores de iões**

O analisador permite a separação de diferentes iões de acordo com a sua razão massa/carga. Apresenta como aspectos importantes a resolução e precisão de massas a analisar, o intervalo de massas e sensibilidade e a capacidade para MS *tandem* (MS/MS ou MS<sup>n</sup>, onde n=2, 3, 4...). Os quatro tipos básicos de analisadores em uso para proteómica são: Trapa Iónica, Tempo-de-voo (TOF), Quadrupolo (Q) e Ressonância Ciclotrónica de Iões com Transformada de Fourier (FT-ICR). Estes analisadores apresentam estruturas e performances diferentes e podem ser utilizados separadamente ou associados de forma a tirar vantagem dos seus pontos fortes. (Aebersold and Mann 2003; Lane 2005)

#### **1.4.1.3. Associação entre fontes iónicas e analisadores**

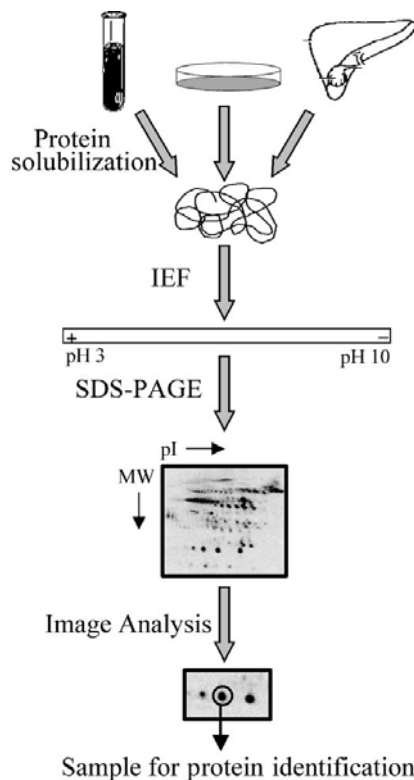
Em proteómica, as fontes de iões mais utilizadas são a MALDI e ESI, por serem técnicas de ionização suave, produzindo iões com baixas energias internas e por consequência provocam pouca fragmentação do analito. A combinação entre a fonte iónica, o analisador de iões e o detector é normalmente determinado de acordo com a aplicação desejada. No entanto, de uma forma geral a MALDI é normalmente associado a analisadores TOF, capazes de medir a massa de peptídeos inteiros, enquanto que a ESI é normalmente associado a trapas iónicas ou espectrómetros com vários analisadores associados como o triplo-quadrupolo ou o quadrupolo-tempo-de-voo (Q-TOF), que permitem a geração de espectros de fragmentos de iões a partir de iões precursores seleccionados. Nos últimos anos as fontes de ionização MALDI têm sido principalmente associadas a Quadrupolos-Trapas Iónicas, TOF-TOF, Q-TOF (em que duas secções TOF ou Quadrupolo e TOF são separadas por um câmara de colisão). Estes instrumentos apresentam boa sensibilidade, resolução e precisão e permitem ainda, a fragmentação de

iões precursores gerados aquando da ionização. (Aebersold and Mann 2003; Guerrero and Kleiner 2005; Lane 2005)

### 1.4.2. Géis 2DE

O proteoma das células é extremamente complexo e constituído por vários milhares de proteínas. De forma a reduzir esta complexidade, 2DE tem sido muito utilizado como o método padrão de separação proteica.

A Electroforese bidimensional em gel de poliacrilamida separa as proteínas de acordo com dois parâmetros independentes, o ponto isoeléctrico (PI) na primeira dimensão



e a massa molecular (MM) na segunda dimensão. Isto é alcançado através da junção de focagem isoeléctrica (IEF) e electroforese em poliacrilamida dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). As proteínas separadas em géis 2D são visualizadas tanto por coloração com coomassie, prata, corantes fluorescentes, por detecção imunológica ou por marcação isotópica e quantificados utilizando densitómetros, *fluoro e/ou phosphoimagers*.

A tecnologia de 2DE tem sido consideravelmente melhorada, tornando o método mais fiável e reprodutível. Foram desenvolvidos programas de análise de imagens dos padrões complexos de *spots* gerados em 2DE de forma a que diferentes utilizadores, com poucos conhecimentos em informática sejam capazes de obter resultados fiáveis. (Yarmush and Jayaraman 2002; Lopez 2007)

**Figura 6.** Esquema típico de 2DE para a obtenção de mapas proteicos, adaptado de Yarmush *et al.*, 2002

Teoricamente, esta técnica é capaz de separar até 10000 proteínas simultaneamente, sendo que por rotina é possível separar 2000. É ainda possível detectar e quantificar amostras com menos de 1 ng por *spot*. (Gorg, Weiss *et al.* 2004; Lopez 2007)

A posição de um *spot* num gel 2D não representa informação suficiente para uma identificação exacta de uma proteína. Para análise de rotina, os pontos de interesse (ex.



proteínas sub- ou sobre-reguladas) são extraídas do gel 2D, digeridas em fragmentos por proteases específicas e depois identificadas utilizando espectrometria de massa (MS) e pesquisa em bases de dados.

Esta técnica apresenta algumas limitações como por exemplo: reprodutibilidade, resolução, a baixa solubilidade de proteínas membranares, intervalo de trabalho limitado, dificuldades com o visionamento e identificação de proteínas pouco abundantes, análise e normalização de imagens e compatibilidade com técnicas de MS para identificação das proteínas de interesse. (Gorg, Weiss *et al.* 2004; Lopez 2007)

### **1.4.3. LC-MALDI/MS/MS e LC-ESI/MS/MS**

Uma estratégia de caracterização proteica, referida frequentemente como *bottom up shotgun proteomics*, LC-MS/MS multidimensional ou tecnologia de identificação proteica multidimensional (MudPIT), envolve a proteólise em solução de uma mistura complexa de proteínas, seguido por separação cromatográfica dos peptídeos obtidos e sequenciação por MS/MS. Frequentemente, antes da digestão a amostra é processada por separação proteica e enriquecida, por exemplo por cromatografia e/ou fraccionamento subcelular. (Resing and Ahn 2005)

As amostras utilizadas em proteómica podem ser muito complexas, por exemplo um digesto proteolítico de um extracto celular pode conter centenas de milhares de peptídeos. Foi demonstrado por Resing and Ahn (2005) que a utilização de nano-LC e ionização por electrospray acoplado com um método de aquisição MS/MS pode ser extremamente útil para a análise de amostras complexas, demonstrando grande sensibilidade, elevada aquisição de dados (1000 precursores/h) e muita informação disponível (espectros MS/MS de grande qualidade)

MALDI em conjunto com análise por MS/MS também tem sido utilizado na aquisição de espectros de amostras após separação por cromatografia líquida, gerando dados que são análogos e complementares com os dados obtidos por LC-ESI/MS/MS. (Bodnar, Blackburn *et al.* 2003)

A expansão contínua de base de dados de proteómica e genómica leva a um aumento do número de espectros de peptídeos necessários para a identificação de proteínas.

A utilização de várias dimensões em cromatografia (LC/LC) pode levar ao aumento da capacidade de cobertura do proteoma. Tipicamente numa experiência LC/LC-MS/MS uma mistura complexa de proteínas ou peptídeos é separada na primeira dimensão por cromatografia de troca catiónica seguido de separação por cromatografia de fase reversa na segunda dimensão. (Bodnar, Blackburn *et al.* 2003)

O desenvolvimento de programas cada vez mais potentes nos espectrómetros de massa actuais permite a sequenciação por “aquisição de dados dependente de dados”, nos quais são seleccionados automaticamente iões para fragmentação por MS/MS, permitindo a aquisição de milhares de espectros numa única “corrida”. (Resing and Ahn 2005) Aumentando o número de espectros únicos de fragmentação de peptídeos adquiridos para pesquisa nas bases de dados deverá permitir a identificação de um número cada vez maior de proteínas, assim como garantir uma maior confiança na identificação de proteínas. (Bodnar, Blackburn *et al.* 2003)

No entanto a caracterização de proteínas apresenta algumas limitações como a sensibilidade e exactidão da identificação dos peptídeos, a discriminação entre diferentes isoformas de proteínas, a quantificação proteica e a análise de modificações covalentes. (Resing and Ahn 2005)

#### **1.4.4. Software para identificação proteica por espectrometria de massa**

Para identificar os peptídeos, os espectros obtidos por MS são comparados com bases de dados de sequências de proteínas utilizando um algoritmo de pesquisa. Foram desenvolvidos vários algoritmos para este tipo de pesquisa. Os mais comuns são o Sequest, o Mascot e o MS-tag. (Lane 2005)

O Sequest utiliza uma aproximação do tipo correlação-cruzada, na qual as sequências de aminoácidos dos peptídeos de uma base de dados de proteínas são utilizados para construir um espectro de massa teórico, e o grau de sobreposição entre o espectro de massa experimental e o teórico determinam a melhor correlação. (Lane 2005)

O Mascot utiliza uma probabilidade baseada na correlação: A razão massa/carga dos fragmentos obtidos por MS/MS, calculada através das sequências dos peptídeos nas

bases de dados, são comparados com os picos observados experimentalmente. De seguida é calculada uma pontuação que reflecte a significância estatística da correlação entre os espectros teóricos e os experimentais. (Lane 2005)

O MS-Tag envolve a análise de uma pequena sequência inequívoca de aminoácidos do peptídeo obtida experimentalmente, que é usado com a massa calculada do peptídeo para determinar a origem da proteína. (Lane 2005)

Para todas estas aproximações, os peptídeos identificados são compilados numa lista de probabilidades. Os algoritmos disponíveis para sequenciação *de novo* são trabalhosos e requerem dados de alta qualidade. Desta forma, os estudos de proteómica de alto rendimento são restritos a proteínas cujas sequências aparecem nas bases de dados pesquisadas, sendo “perdidas” muitas proteínas modificadas pós-tradução ou mutadas. (Lane 2005)



# **MATERIAIS E MÉTODOS**



## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Reagentes

Os reagentes utilizados na realização deste trabalho eram de grau analítico.

- Ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico 70990, Sigma-Aldrich;
- Mistura de calibrantes 4700 Cal Mix para o espectrómetro de massa MALDI-TOF/TOF 4800 Applied Biosystems, Applied Biosystems, Foster City, USA;
- Imobilinas pH 3-11 NL, Amersham Pharmacia Biotech Europe, Uppsala, Sweden;
- Kit de quantificação de proteína, *RC DC Protein Assay*, 500-0119, BIO RAD, Hercules, USA;
- Tiras IPG (13 cm, pH 3-11 NL), Amersham Pharmacia Biotech Europe, Uppsala, Sweden;
- Tripsina, Promega, Madison, USA;
- 2-D Clean-Up Kit, 80-6484-51, Amersham biosciences, Piscataway, USA.

### 2.2. Equipamentos

- Aparelho de focagem isoeléctrica, IPGPhor, Amersham Pharmacia Biotech, Sweden;
- Câmara de fluxo laminar classe II, Microflow Bioquell, UK;
- Centrífuga, 2K 15, SIGMA, Germany;
- Espectrofotómetro, Genesys 6, Thermo, Madison, USA;
- Espectrómetro Triplo-Quadrupolo Quattro, Micromass, Manchester, UK
- Espectrómetro de massa, MALDI-TOF/TOF 4800 Proteomics Analyzer, Applied Biosystems, Foster City, USA;
- Fonte de alimentação para electroforese, EPS 601, Amersham Pharmacia Biotech, Sweden;
- Microcentrífuga, Mini Spin Plus, Eppendorf, Hamburg, Germany;
- Microscópio electrónico de transmissão, Zeiss EM 10A, Germany;
- Módulo de HPLC, Ultimate 3000, LC Packings, USA;

- Speed Vac® Plus SC 210 A, Thermo Savant, USA;
- Tina de electroforese vertical, Hoefer SE 600 Series, Amersham Pharmacia Biotech, Sweden;

### **2.3. Procedimento experimental**

Foram constituídos 3 grupos com 5 ratos cada, correspondentes ao grupo controlo e aos grupos com injeção intra-peritoneal (i.p.) de MDMA. Sendo o grupo controlo (injectado com solução salina) sacrificado ao tempo de 1 hora (3 ratos) e 24 horas (2 ratos), e os restantes sacrificados ao tempo de 1 hora (MDMA 1h) e 24 horas (MDMA 24h) após a última injeção i.p. No total foram efectuadas 4 injeções, de 2 em 2 horas, de 10 mg/kg de MDMA, perfazendo um total de 40 mg/kg em 6 horas.

### **2.4. Preparação de glândula lacrimal para microscopia electrónica de transmissão**

Pequenas secções (~1mm<sup>3</sup>) de glândula lacrimal foram imersas numa solução de glutaraldeído a 2.5% em cacodilato de sódio 0.1M, pH 7.2 durante um período de 2 horas. Após algumas lavagens com tampão cacodilato de sódio a 0.1M, as secções de tecido foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 2%. De seguida lavou-se com cacodilato de sódio a 0.2M e procedeu-se à desidratação dos tecidos com soluções de etanol de concentrações crescentes. Os tecidos foram impregnados com a resina Epon (TAAB) e incubados a 50°C, durante aproximadamente 48 horas, com o intuito de promover a polimerização da resina. Secções ultrafinas (100 nm) foram coradas com acetato de uranilo e citrato de chumbo para posterior análise num microscópio electrónico de transmissão (modelo EM10A, Zeiss, Alemanha).



## 2.5. Subfraccionamento das glândulas lacrimais

As glândulas lacrimais de rato foram homogeneizadas e subfraccionadas, seguindo um protocolo anteriormente descrito por Patamia e colaboradores (2005), com algumas modificações. (Patamia, Messana *et al.* 2005)

As glândulas lacrimais foram extraídas rapidamente de ratos sacrificados. O tecido glandular após remoção do tecido conjuntivo e adiposo foi dividido em pedaços, com a ajuda de um bisturi. Seguidamente o tecido foi homogeneizado, numa suspensão de 5% (m/v), num meio de homogeneização contendo: 340 mM de sacarose; 0.5 mM EDTA; 10 mM HEPES e pH 7.4. Depois o homogeneizado foi centrifugado a 500 g durante 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi submetido a uma centrifugação de 2500 g durante 30 minutos a 4°C, correspondendo o respectivo *pellet* à fracção enriquecida em citoplasma das células acinares.

## 2.6. Quantificação da proteína presente nas amostras

A quantificação de proteína presente nas amostras foi determinada através da utilização de um ensaio colorimétrico *RC DC protein assay* da BIO RAD®. Este ensaio baseia-se numa modificação do protocolo de Lowry e colaboradores (1951), permitindo a quantificação de proteína na presença de agentes redutores e detergentes.

Prepararam-se 5 diluições de um padrão de proteína desde 0.2 mg/mL a 2 mg/mL, para a construção de uma curva de calibração. Pipetaram-se 20 µL de amostras e de padrões para microtubos novos. Adicionaram-se 125 µL de reagente I em cada microtubo e agitaram-se no vórtex. Incubaram-se os microtubos 1 minuto à temperatura ambiente (TA). Adicionaram-se 125 µL de reagente II em cada microtubo e agitaram-se no vórtex. Centrifugaram-se os tubos a 15000 g durante 5 minutos. Decantou-se o sobrenadante e colocaram-se os tubos na *SpeedVac*®, removendo a totalidade do líquido. De seguida adicionaram-se 127 µL de reagente A' a cada microtubo, agitaram-se no vórtex e incubaram-se durante 5 minutos à TA. Adicionou-se 1 mL de reagente B a cada microtubo e agitaram-se no vórtex imediatamente. Incubaram-se à TA durante 15 minutos. Após incubação, leram-se as absorvâncias num espectrofotómetro a 750 nm. (Lowry, Rosebrough *et al.* 1951)

## 2.7. Electroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2DE)

Misturou-se a quantidade de tampão de rehidratação necessária para solubilizar a amostra perfazendo um volume máximo de 250  $\mu\text{L}$ . Aplicaram-se 250  $\mu\text{L}$  desta mistura na extremidade anódica do *IPG strip holder*. Depois, com a ajuda de uma pinça, retirou-se a parte protectora da tira e colocou-se no *IPG strip holder* começando por encaixar a tira do lado do ânodo. Levantou-se ligeiramente o *IPG strip holder* e foi-se mergulhando a tira lentamente, com o objectivo de evitar a formação de bolhas de ar debaixo da tira. Seguidamente adicionaram-se algumas gotas de óleo mineral cobrindo toda a tira, para evitar a desidratação. Finalmente, colocou-se o *IPG strip holder* no aparelho de focagem isoeléctrica de acordo com as instruções do aparelho. Seleccionou-se o programa pretendido e indicou-se o número de tiras utilizadas. O programa de focagem isoeléctrica compreendeu as seguintes fases (temperatura a 20°C):

- i. 12h de rehidratação a 50mW
- ii. 2h a 150 Volts (GRADIENT)
- iii. 1h a 500 Volts (GRADIENT)
- iv. 1h a 1000 Volts (GRADIENT)
- v. 2h a 8000 Volts (STEP-N-HOLD)

Depois de decorrido o tempo de focagem retiraram-se as tiras e secaram-se com papel de filtro. Introduziu-se cada tira num tubo de plástico e adicionou-se-lhe 5 mL de tampão de equilíbrio, ficando a agitar durante 15 minutos. As tiras foram aplicadas no cimo de um gel de SDS-PAGE (12 cm x 14 cm; 12.5%) após lavagem com tampão de corrida. Aplicou-se uma solução selante de agarose e um separador que serve para a aplicação dos marcadores de peso molecular. Depois da agarose solidificar retiraram-se os separadores e aplicaram-se os marcadores de peso molecular. Introduziu-se o sistema dentro da tina de electroforese e iniciou-se a corrida com 200 V, 75 mA e 15 W. Deixou-se correr a electroforese até o corante atingir a parte inferior do gel.

## 2.8. Revelação dos géis de 2-DE

### 2.8.1 Revelação com prata reversível

A revelação com prata reversível realizou-se de acordo com Yan e colaboradores (2000). Retiraram-se os géis da cassete e colocaram-se em agitação na solução fixadora durante 30 minutos. Lavaram-se com água destilada e colocaram-se em agitação na solução de sensibilização durante 30 minutos. Lavaram-se os géis novamente em água destilada duas vezes durante 7 minutos. Seguidamente agitaram-se os géis em nitrato de prata durante 20 minutos. Voltaram-se a lavar os géis em água destilada durante 1 minuto. De seguida, agitaram-se os géis na solução reveladora, até ser suficiente para se observarem os *spots* com uma boa resolução e depois adicionou-se EDTA agitando novamente durante 10 minutos para fixar os *spots*. (Yan, Wait *et al.* 2000)

### 2.8.2 Revelação com coomassie coloidal

Para a identificação de proteínas, os géis foram revelados com coomassie coloidal de acordo com Bradford (1976). Retiraram-se os géis da cassete e fixaram-se os *spots* colocando os géis em agitação durante 2 horas na solução de 40% metanol/10% ácido acético. Seguidamente retirou-se a solução de fixação e colocou-se uma solução de coomassie coloidal G250 durante 12 horas. A descoloração efectuou-se através de duas lavagens de 45 minutos utilizando uma solução de 25% de metanol. Finalmente colocou-se o gel em água destilada. (Bradford 1976)

## 2.9. Análise dos dados de 2DE

Os géis foram digitalizados em duplicado (FX; Bio-Rad, Hercules, USA), e as imagens foram processadas pelo software PDQuest (v 7.1; Bio-Rad). A quantificação da proteína de cada *spot* foi executada nas imagens dos géis 2DE baseada nas densidades ópticas.

## 2.10. Nano-HPLC de digestos trípticos de peptídeos

A extracção dos peptídeos das glândulas lacrimais efectuou-se de acordo com Patamia e colaboradores 2005. A uma fracção de grânulos secretores, adicionou-se num microtubo 250  $\mu\text{L}$  de ácido acético 1 M e refrigerou-se a 4°C durante 4 horas. De seguida centrifugou-se a amostra, recolhendo o sobrenadante contendo os péptidos para um novo microtubo. A 20  $\mu\text{L}$  de *pellet* contendo péptidos das glândulas secretoras adicionaram-se 100  $\mu\text{L}$  de hidrogenocarbonato de amónio e 20  $\mu\text{L}$  de tripsina (0.2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) e digeriram *overnight* a 37°C. A reacção foi parada pela acidificação por adição de TFA até a concentração final de 0.1%. As amostras foram secas na *SpeedVac*<sup>®</sup> e ressuspensas em 6% de ACN/ 0.1% TFA.

A separação por nano-HPLC foi executada no módulo de separação Ultimate 3000 (LC Packings) utilizando uma coluna capilar (C18 Zorbax SB 300; 0.75  $\mu\text{m}$  diâmetro interno; 15 cm comprimento). Utilizou-se o solvente A, água/ACN/TFA (95:5:0.05, v/v/v) e solvente B, água/ACN/TFA (20:80:0.04, v/v/v). Foi injectada 1  $\mu\text{L}$  de amostra (3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ). A separação foi executada utilizando um gradiente linear (5-55% B, durante 30 minutos; 55-80% B, durante 10 minutos e 80-5% A, durante 5 minutos) com um caudal de 100 nL/min. Os peptídeos depois de eluirm da coluna capilar nanolítica foram depositados directamente numa placa de MALDI de 384 poços, em intervalos de 20s para cada *spot*, utilizando o *Probot* (LcPackings) com adição de 170 nL de matriz  $\alpha$ -ciano (preparada diluindo a matriz  $\alpha$ -ciano com 70% acetonitrilo/0.1% TFA e a adição de 10 fmol de Glu-Fib, utilizado como padrão interno).

## 2.11. Identificação de proteínas

### 2.11.1 Digestão das proteínas com tripsina

A tripsina é uma protease serínica que cliva especificamente as ligações peptídicas no lado carboxílico da arginina e da lisina. No entanto, quando uma prolina se encontra do lado carboxílico de uma arginina ou lisina, normalmente a tripsina não consegue clivar a ligação. A capacidade de clivagem da tripsina também é consideravelmente reduzida

quando resíduos ácidos estão presentes no mesmo lado de uma potencial ligação susceptível. A tripsina não modificada é alvo de proteólise, gerando fragmentos que podem interferir com a análise de proteínas ou transformando-se em pseudotripsina, exibindo especificidade tipo quimiotripsina. (Keil-Dlouha, Zylber *et al.* 1971; Rice, Means *et al.* 1977)

O protocolo de digestão trípica realizou-se de acordo com Detweiller e colaboradores (2002), utilizando tripsina porcina modificada (Promega Corporation, U.S.A.). Os *spots* de proteína foram extraídos do gel com a ajuda de uma espátula e colocados em microplacas PCR (96 poços). Os pedaços de gel foram lavados duas vezes com bicarbonato de amónio 50 mM /50% ACN e desidratados na *SpeedVac*<sup>®</sup>. De seguida, adicionaram-se 20 µL de tripsina 10 µg/mL em bicarbonato de amónio 50 mM a cada amostra e incubaram-se na estufa a 37° C durante a noite. Depois da digestão removeram-se os péptidos extraídos para novas microplacas PCR e desidrataram-se completamente na *SpeedVac*<sup>®</sup>. (Detweiler, Deterding *et al.* 2002)

### 2.11.2 Espectrometria de massa

Segundo Detweiller e colaboradores (2002), depois da digestão, reconstituíram-se os péptidos em 5 µL de uma solução 50:50 de água/ACN 0.1% ácido fórmico. Aplicou-se em cada ponto da placa de MALDI 0.5 µL de amostra e 0.5 µL de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico preparado em 50% ACN/0.1% ácido fórmico e deixou-se secar. Os espectros foram obtidos num espectrómetro de massa MALDI-TOF-TOF em modo positivo (4800 Proteomics Analyzer; Applied Biosystems) no intervalo de massas desde os 800-4000 Da, com 1500 tiros de laser. Os picos resultantes da autólise da tripsina serviram como calibrantes internos do aparelho. Se não se encontrassem picos de tripsina utilizava-se um calibrante externo.

### 2.11.3 Pesquisa nas bases de dados

Os espectros foram processados e analisados pela *Global Protein Server Workstation*, da Applied Biosystems, utilizando o software Mascot (Matrix Science Ltd, UK) para a pesquisa dos *peptide mass fingerprints* e dos dados de MS/MS nas bases de dados não redundantes da SwissProt e da NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Para uma maior confiança nos resultados das identificações foram utilizados nas pesquisas tanto os espectros de MS como os de MS/MS. Os desvios introduzidos na pesquisa para identificação das proteínas para dados de MS e de MS/MS foram de  $\pm 40$  ppm e de  $\pm 0.3$  Da, respectivamente. A identificação da proteína foi aceite quando o grau de confiança era superior a 98%.

## 2.12. Extracção e quantificação de 3,4-metilenodioximetanfetamina em diferentes amostras

### 2.12.1 Amostras de Urina e Plasma

A quantificação de 3,4- MDMA presente nas diferentes amostras foi adaptada de Soares e colaboradores. Foram acidificados 1 ml de amostra e de solução padrão de *ecstasy* com 37% de HCl (1:1) e hidrolisadas durante uma hora a 100° C. Após arrefecer a amostra foi transferida para uma coluna OASIS<sup>®</sup> MCX sem pré-condicionamento. De seguida foram efectuadas duas lavagens (2ml) sequenciais com 0.1 M HCl e metanol, sendo os compostos eluídos com 2ml de 5% de hidróxido de amónio em metanol. As amostras foram levadas à secura na *SpeedVac*<sup>®</sup> e reconstituídos em 500 µl de metanol/água (50:50), 1% ácido acético. Por fim as amostras foram diluídas na solução de metanol/água (50:50), 1% ácido acético. Os padrões e as amostras do grupo MDMA 1h foram injectados no espectrómetro de massa (Triplo-Quadrupolo), depois de diluídos (1:100) na solução de ressuspensão. Para as amostras do grupo controlo e MDMA 24h, foram testadas diluições de 1:50. (Soares, Carvalho *et al.* 2004)

### **2.12.2 Amostras de tecidos de rato**

Cada tecido foi homogeneizado em 2 ml de Acetato de Sódio 2M (pH 4.0). Durante a homogeneização as amostras foram mantidas em gelo. O material foi lavado entre amostras, com água e metanol. Após obtenção do homogeneizado, as amostras foram quantificadas seguindo o mesmo procedimento da quantificação das amostras de urina. Apenas foi adicionado um passo de centrifugação de 10 min., 2500 rpm após o fim da hidrólise ácida.

### **2.12.3 Análise da 3,4-metilenodioximetanfetamina com espectrómetro de massa Triplo-Quadrupolo**

As amostras foram introduzidas no espectrómetro de massa a fluxo de 10 µl/min. A voltagem do cone foi de 25 V e do capilar de 3 kV. A temperatura da fonte foi de 80°C e a temperatura de dessolvatação de 150°C. Espectros de MS/MS foram obtidos utilizando Árgon como gás de colisão. A pressão do gás na célula Q2 foi de  $\sim 1.4 \times 10^{-3}$  mbar. A energia de colisão foi de 12 eV. A aquisição de dados foi efectuada com o software MassLynx 4.





# RESULTADOS

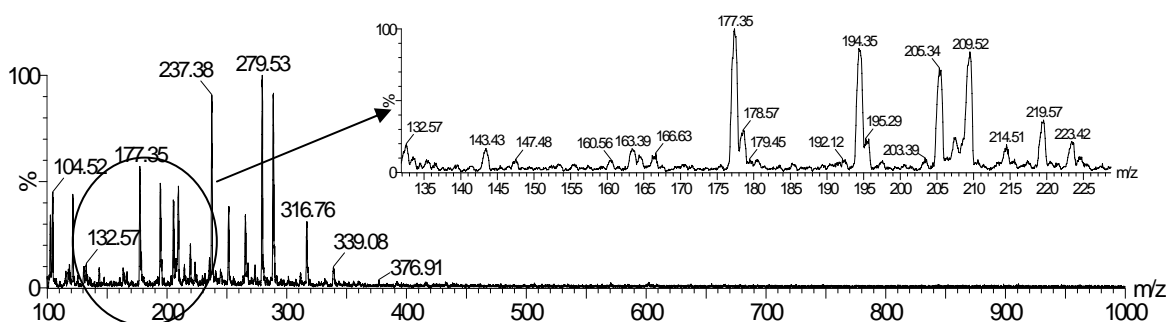


### 3. RESULTADOS

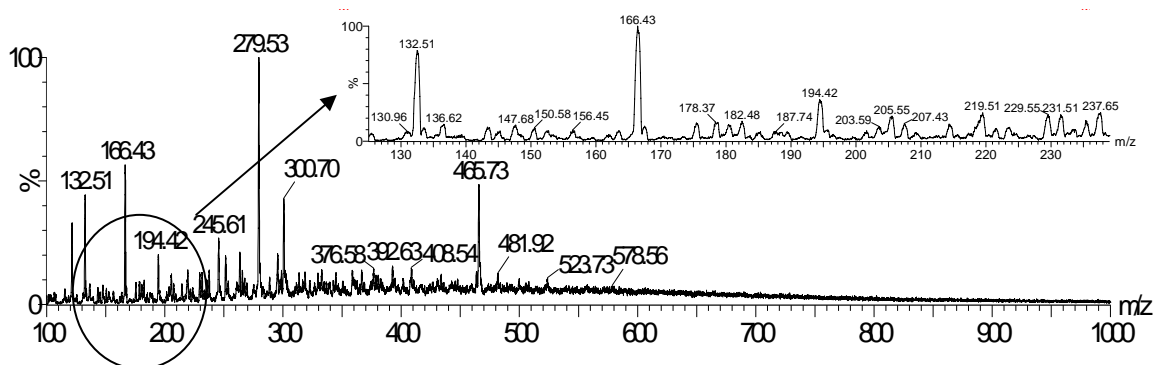
#### 3.1. Quantificação da 3,4-metilenodioximetanfetamina

Foram constituídos 3 grupos com 5 ratos cada, correspondentes ao grupo controlo e aos grupos com injeção intra-peritoneal (i.p.) de MDMA. Sendo o grupo controlo (injectado com solução salina) sacrificado ao tempo de 1 hora e 24 horas, e os restantes sacrificados ao tempo de 1 hora (MDMA 1h) e 24 horas (MDMA 24h) após a última injeção i.p. No total, foram efectuadas 4 injeções, de 2 em 2 horas, de 10 mg/kg de MDMA, perfazendo um total de 40 mg/kg em 6 horas. É de salientar que esta é uma dose subletal.

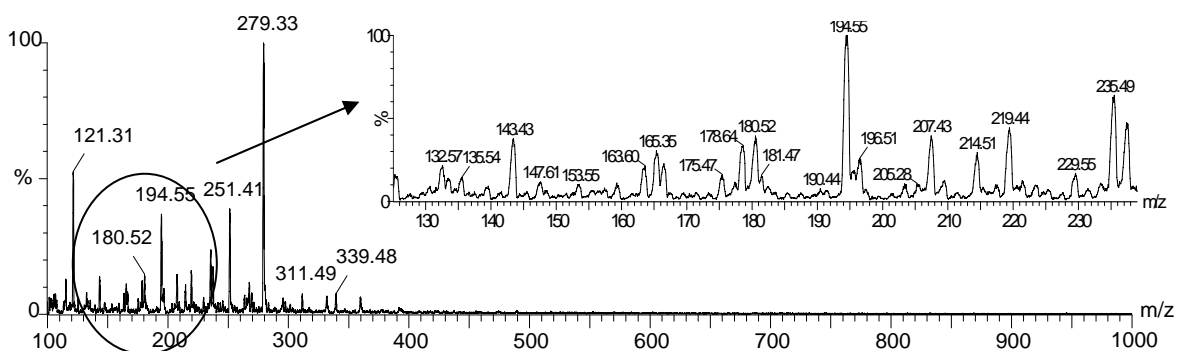
A quantificação da MDMA foi efectuada por espectrometria de massa, utilizando como método de ionização o electrospray operando em modo positivo. Após a hidrólise ácida e extracção em fase sólida das amostras, estas foram injectadas directamente no espectrómetro do tipo triplo-quadrupolo (TQ). Utilizando padrões de MDMA é possível construir uma curva de calibração com base na relação entre a corrente iónica e a concentração de cada padrão. De seguida apresentam-se espectros representativos de um padrão MDMA de 200ng/ml, de uma amostra de tecido e de uma amostra de urina, em que o ião de  $m/z$  194 corresponde à MDMA.



**Figura 7.** Espectro de varrimento obtido no Triplo-Quadrupolo após ionização por electrospray, em modo positivo, do padrão MDMA (ião de  $m/z$  194) de 200 ng/ml.

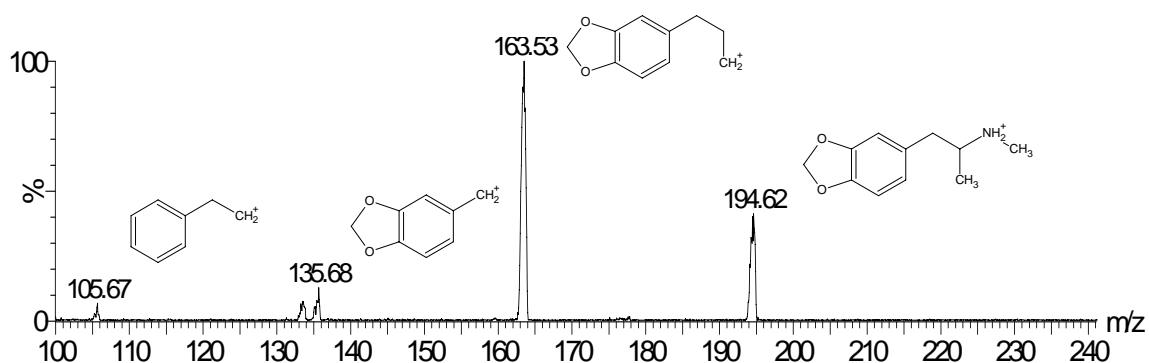


**Figura 8.** Espectro de varrimento obtido no Triplo-Quadrupolo após ionização por electrospray, em modo positivo, de uma amostra de rim do grupo MDMA 1h (ião de m/z 194).

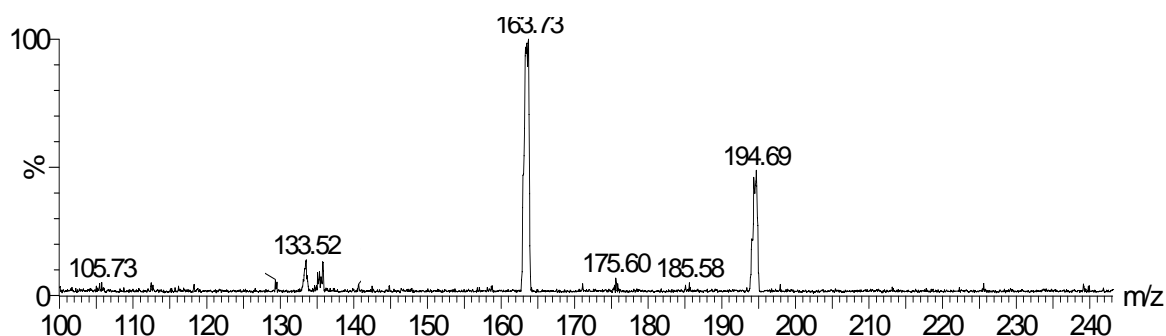


**Figura 9.** Espectro de varrimento obtido no Triplo-Quadrupolo após ionização por electrospray, em modo positivo, de uma amostra de urina do grupo MDMA 1h (ião de m/z 194).

Com esta técnica é possível confirmar a presença da MDMA através do ião de razão massa carga (m/z) de 194. A massa molecular da MDMA é de 193, sendo necessário adicionar a massa de 1 próton, após a ionização da molécula. É ainda possível confirmar que o ião com m/z de 194 corresponde à *ecstasy* através do espectro de MS/MS, que indica os fragmentos mais comuns da MDMA (163, 135, 105), estes resultados encontram-se de acordo com a literatura. (Kronstrand, Nystrom *et al.* 2004; Pichini, Pacifici *et al.* 2004; Wood, Laloup *et al.* 2005) Na figura 10 e 11 encontram-se representados os espectros de MS/MS de uma amostra padrão e de uma amostra do grupo MDMA 1h. Adicionou-se à figura 10, a estrutura química da MDMA e a estrutura provável para cada um dos fragmentos obtidos.



**Figura 10.** Espectro de massa (MS/MS) do ião de m/z 194 obtido a partir do padrão de MDMA de 200 ng/ml. Apresenta-se também a estrutura química da MDMA e dos fragmentos obtidos.



**Figura 11.** Espectro de massa (MS/MS) do ião de m/z 194 obtido a partir de uma amostra de fígado do grupo MDMA 1h.

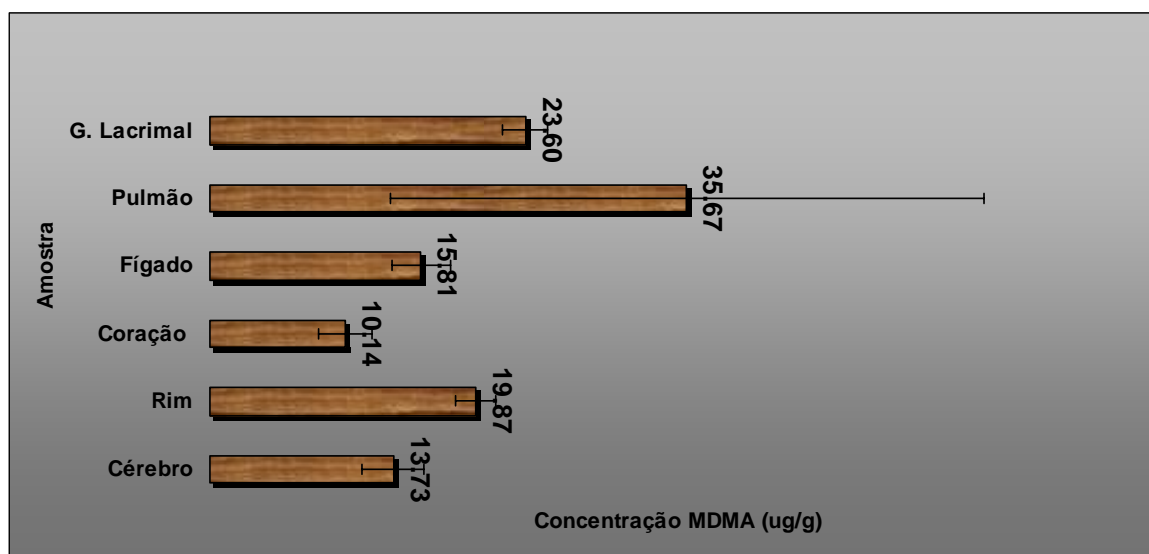
Utilizando este método foi possível quantificar a *ecstasy* presente em cada um dos tecidos analisados no grupo MDMA 1h. Na tabela 3 encontram-se os resultados obtidos para cada rato do grupo MDMA 1h. Após extração dos tecidos, cada amostra foi quantificada em triplicado. O desvio padrão obtido é apresentado como percentagem em relação à média da concentração. Os valores obtidos mostram que há diferenças de concentração de MDMA nos tecidos entre os 2 ratos, com destaque para a diferença entre os valores obtidos na quantificação da MDMA no pulmão. O desvio padrão encontra-se abaixo de 15%, excepto na quantificação da MDMA no coração do rato 1.

É de salientar que com o método utilizado não foi possível detectar a presença da MDMA em qualquer um dos restantes grupos.

**Tabela 3.** Concentração em µg/g das diferentes amostras analisadas de cada rato do grupo MDMA.

Orgão	Concentração (µg/g)	Desvio Padrão (%)
<b>Rato 1</b>		
Cérebro	15.36	3.4
Rim	20.89	1.9
Coração	11.54	15.9
Fígado	14.23	1.7
Pulmão	20.02	12.3
Glândula Lacrimal	22.42	8.6
<b>Rato 2</b>		
Cérebro	12.09	8.3
Rim	18.84	8.8
Coração	8.73	13.5
Fígado	17.39	3.0
Pulmão	51.33	4.2
Glândula Lacrimal	24.78	6.1

O gráfico seguinte foi construído com a média dos valores obtidos para o grupo MDMA 1h e os respectivos desvios padrão, onde se pode verificar que a glândula lacrimal e o rim apresentam concentrações mais elevadas, seguidos pelo cérebro e fígado e por último o coração que apresenta a concentração mais baixa de MDMA. O pulmão apesar de apresentar a média de concentração de MDMA mais elevada apresenta também um desvio padrão muito grande, que reflecte a diferença de concentração observada entre os dois ratos deste grupo.

**Figura 12.** Média das concentrações de 3,4-metilenodioximetanfetamina determinadas, em diferentes tecidos, no grupo MDMA 1h.

### 3.2. Caracterização da fracção subcelular de glândula parótida

De forma a reduzir a complexidade da amostra a analisar, efectuou-se o fraccionamento das glândulas lacrimais de rato de acordo como o protocolo descrito. Após a homogeneização da glândula procedeu-se a uma centrifugação a baixa velocidade. O *pellet* obtido, rico em núcleo, membrana citoplasmática e citoesqueleto foi descartado, procedendo-se a uma segunda centrifugação do sobrenadante. O novo *pellet* foi designado como fracção enriquecida de citoplasma, e constituiu a base de trabalho desta dissertação.

#### 3.2.1. Caracterização por 2DE

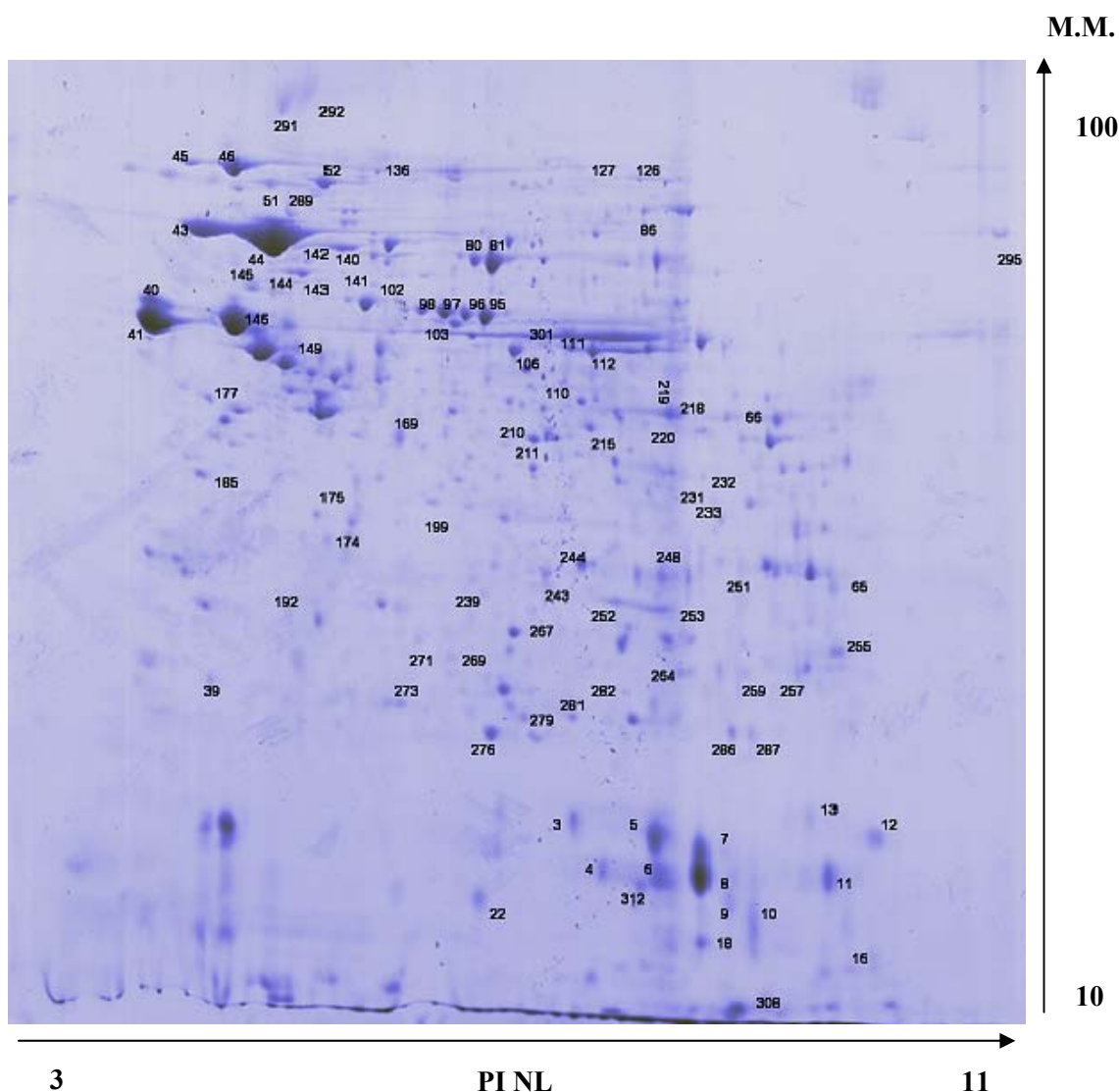
Para investigar os efeitos da *ecstasy* na expressão proteica da glândula lacrimal, foram realizados géis 2D de amostras de 2 ratos por grupo. Na primeira dimensão foi utilizado um grande espectro de pH (pH 3-11 não linear) de forma a separar tanto as proteínas ácidas como as básicas. Na segunda dimensão foi realizada com gel de poliacrilamida de 12.5%, de forma a garantir a separação das proteínas de elevado peso molecular e de baixo peso molecular. Foram utilizados 100 µg de proteína total para os géis 2D revelados com prata reversível. Estes géis apresentam elevada sensibilidade e razoável confiança em semi-quantificação de mapas proteicos. Para identificação proteica por espectrometria de massa foi preferida a revelação com coomassie, de forma a garantir proteína suficiente por *spot*. Nestes géis, devido à menor sensibilidade da revelação com coomassie foram utilizados 300 µg de proteína total por amostra. Obteve-se um padrão similar entre os géis revelados com prata e com coomassie.

Nos géis 2DE obtidos após coloração com prata reversível, observaram-se  $1037 \pm 86$  *spots* no grupo controlo,  $936 \pm 175$  *spots* no grupo MDMA 1h e  $907 \pm 205$  *spots* no grupo MDMA 24h (n=2). Com a ajuda de software de análise comparativa de géis (PDquest) obteve-se a identificação comum (*match*) de  $558 \pm 13$  *spots* entre o grupo MDMA 1h e o grupo controlo e  $565 \pm 31$  *spots* entre o grupo MDMA 24h e o controlo.

Foram extraídos 316 *spots* do gel 2DE realizado com amostra do grupo MDMA 1h e corado com coomassie coloidal. Destes foram identificados 92 *spots* correspondentes a 60 proteínas diferentes. Uma vez que mantendo as mesmas condições tanto para a primeira

dimensão como para a segunda dimensão da 2DE, as proteínas presentes numa mesma amostra apresentam sempre o mesmo perfil de separação, foi estabelecida a correspondência entre os spots identificados nos géis de coomassie com os géis de prata. Sendo possível estabelecer uma correlação entre 66 spots (45 proteínas) nos géis de prata dos 3 grupos de amostras, com o objectivo de analisar uma possível variação da densidade óptica (DO) de cada *spot*.

De seguida apresenta-se um gel 2DE do grupo MDMA 1h, em que se assinala os *spots* identificados por MALDI/TOF/TOF.



**Figura 13.** Mapa 2DE revelado com coomassie da amostra do grupo MDMA 1h. Foram separados 300 µg de proteína, horizontalmente num gel IPG, pH 3-11 não linear (NL) e verticalmente num gel SDS-PAGE 12,5%. Os números correspondem aos *spots* identificados.



Na tabela 4 apresenta-se as proteínas identificadas por análise 2DE e MALDI/TOF/TOF, comuns aos 3 grupos e a razão entre a densidade óptica do grupo MDMA 1h com o controlo e entre o grupo MDMA 24h e o controlo. O conjunto de proteínas identificadas foi agrupado de acordo com a sua função conhecida.

**Tabela 4.** Proteínas identificadas por MALDI/TOF/TOF, após separação por 2DE. Apresenta-se a relação da densidade óptica obtida entre o grupo MDMA 1h e o controlo e entre o grupo MDMA 24h e o controlo.

Spot	Nome da proteína	Número de acesso	MDMA 1h Vs Controlo	MDMA 24h Vs Controlo
<b>Degradação proteica</b>				
3	Proteína 1 relacionada com a cistatina prec.	P22282	1.3±1.1	0.6±0.9
4	Proteína 1 relacionada com a cistatina prec.	P22282	0.5±0.1	0.6±0.7
5, 6	Proteína 1 relacionada com a cistatina prec.	P22282	1.2±0.5	0.6±0.6
7, 8	Proteína 1 relacionada com a cistatina prec.	P22282	1.0±0.6	0.5±0.0
11	Proteína 1 relacionada com a cistatina prec.	P22282	1.7±0.2	1.3±0.8
18	Proteína 1 relacionada com a cistatina prec.	P22282	1.2±0.8	0.5±0.2
169	Catepsina D prec.	P24268	0.9±0.3	0.8±0.7
<b>Reparação de Proteínas</b>				
12	Peptidil-prolil cis-trans isomerase B prec.	P24368	0.7±0.2	0.8±0.7
40, 41	Calreticulina prec.	P18418	0.7±0.4	0.5±0.1
43, 44	Proteína regulada pela glucose 78 kDa prec. (GRP 78)	P06761	1.1±0.3	0.8±0.7
177	Proteína regulada pela glucose 78 kDa prec. (GRP 78)	P20029	<b>3.7±0.5</b>	<b>2.2±0.1</b>
46	Endoplasmína prec.	P08113	0.6±0.2	0.6±0.4
145	Endoplasmína prec.	P08113	1.5±0.3	1.1±0.4
95, 96	Proteína dissulfeto isomerase A3 prec.	P11598	0.6±0.5	0.7±0.6
97, 98	Proteína dissulfeto isomerase A3 prec.	P11598	1.1±0.1	1.0±0.5
239	Proteína dissulfeto isomerase A3 prec.	P11598	0.8±0.5	1.0±0.3
140, 141	Proteína de choque térmico 71 KDa	P63018	1.1±0.1	1.3±0.4
146	Proteína dissulfeto isomerase prec.	P04785	0.9±0.1	0.8±0.2
149	Proteína dissulfeto isomerase A6 prec.	Q63081	1.6±0.1	1.4±0.3

Spot	Nome da proteína	Número de acesso	MDMA 1h Vs Controlo	MDMA 24h Vs Controlo
185	Endoplasmina	P08712	1.2±0.1	0.8±0.2
267	Proteína do Retículo Endoplasmático	P52555	0.8±0.6	1.0±0.6
269	Proteína de choque térmico beta-1 (HSP27)	P42930	<b>3.5±0.1</b>	<b>1.5±0.6</b>
<b>Oxidação/Redução</b>				
22	Superóxido dismutase [Cu-Zn]	P07632	<b>0.6±0.2</b>	<b>0.6±0.1</b>
215	Acyl-CoA desidrogenase	P15650	1.3±0.4	1.7±0.3
233	Tiosulfato sulfurtransferase	P24329	0.7±0.2	1.2±0.0
243, 244	Delta3,5-delta2,4-dienoyl-CoA isomerase	Q62651	1.2±0.4	1.5±0.4
248	Flavoproteína de transferência de electrões subunidade-alfa	P13803	1.0±0.8	1.2±0.5
255	Glutathione S-transferase Yc-1	P04904	0.9±0.5	1.0±0.5
264	Glutathione S-transferase Yb-2	P08010	0.9±0.2	1.5±0.2
271	NADH-ubiquinona oxidoreductase subunidade 30 kDa, mitocondrial prec.	Q9DCT2	0.8±0.4	0.8±1.0
286	Superóxido dismutase [Mn]	P07895	<b>1.5±0.0</b>	<b>1.5±0.2</b>
287	Peroxiirredoxina 1	Q63716	<b>2.6±0.7</b>	<b>2.0±0.7</b>
<b>Transporte</b>				
80, 81	Albumina do Soro prec	P02770	0.5±0.1	0.9±1.1
174	Alfa-solúvel NSF proteína anexa	P54921	0.7±0.2	0.6±0.3
252	ATP sintetase cadeia alfa, mitocondrial prec.	P15999	0.3±1.1	1.7±0.3
281, 282	ATP sintetase cadeia alfa, mitocondrial prec.	P15999	1.1±0.5	0.9±0.6
279	ATP sintetase cadeia alfa, mitocondrial prec.	P15999	1.3±0.2	2.1±0.1
273	Proteína Rab relacionada com Ras	Q6NYB7	1.1±0.1	1.1±0.9
<b>Metabolismo</b>				
65	2,4-dienoil-CoA reductase, mitocondrial prec.	Q64591	1.1±0.2	1.1±0.7
66	Isocitrato desidrogenase [NADP], mitocondrial prec.	P56574	<b>2.8±0.4</b>	<b>3.4±0.1</b>
106	Enolase Alpha	P04764	0.8±0.3	1.0±0.7
211	Isovaleri-CoA desidrogenase, mitocondrial prec.	P12007	0.8±0.7	0.7±0.9
251	Malato desidrogenase, mitocondrial prec.	P04636	<b>1.9±0.5</b>	<b>1.9±0.3</b>
257	3-hiroxici-CoA desidrogenase tipo II	O70351	1.1±0.1	2.1±0.3

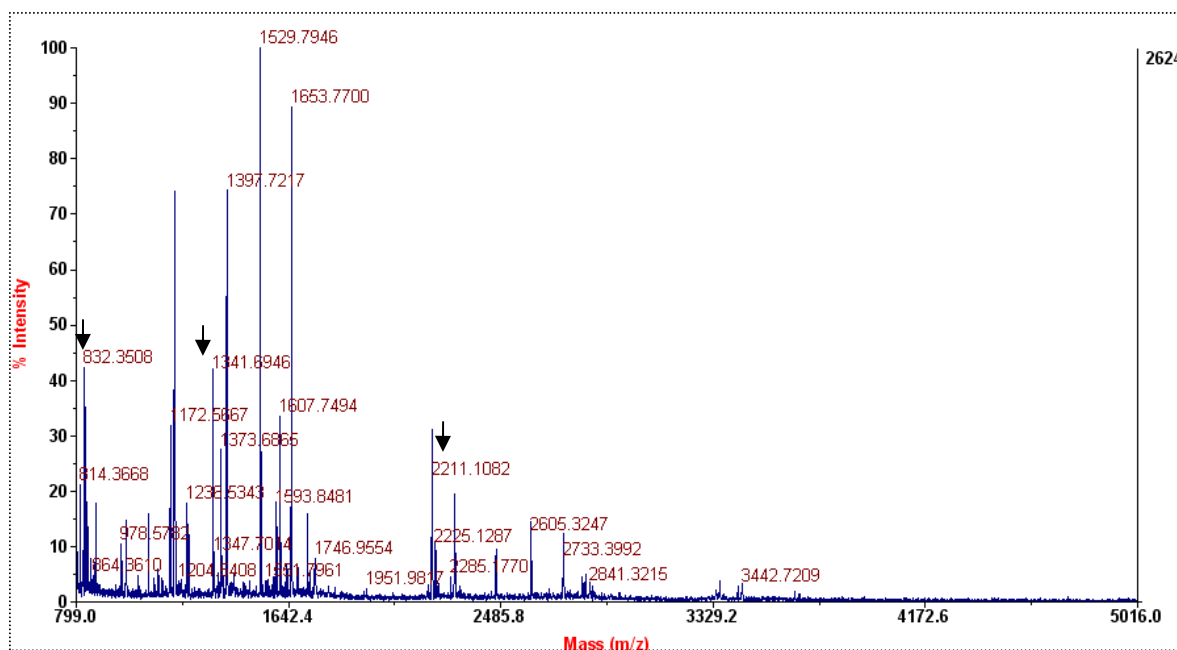
Spot	Nome da proteína	Número de acesso	MDMA 1h Vs Controlo	MDMA 24h Vs Controlo
259	GTP:AMP fosfotransferase mitocondrial	P29411	1.0±0.5	1.0±0.6
312	Nucleoside difosfate cinase B	P19804	0.6±0.2	0.6±0.4
<b>Estrutural/Citoesqueleto</b>				
142	L-plastina	Q61233	1.5±0.1	1.6±0.8
308	Profilina-1	P62963	1.1±1.1	0.9±0.1
9	Destrina	Q9R0P5	1.6±0.4	1.1±0.4
39	Proteína tumor controlada Translacionalmente	P63029	0.7±0.5	0.7±0.7
<b>Síntese Proteica</b>				
16	Proteína ligante-DNA de cadeia simples, mitocondrial prec	P28042	0.9±0.1	1.4±0.5
192	Proteína SA ribossomal 40S	P38983	<b>1.4±0.1</b>	<b>2.2±0.3</b>
199	Proteína ribossomal acídica 60S	P19945	1.0±0.5	1.5±0.6
<b>Outras</b>				
276	ATP sintase cadeia D	P31399	0.9±0.6	1.3±0.7
175	Pirofosfatase Inorgânica	Q9D819	1.0±0.3	0.7±0.1
10	Proteína ARMET prec.	Q9CXI5	1.0±0.0	0.6±0.3

Observaram-se algumas variações da expressão proteica dos grupos identificados na tabela anterior que serão postas em evidência de seguida, e quando possível, será descrita uma visão global da variação do grupo e focadas as proteínas com variações mais significativas. Assim, o grupo constituído por proteínas ligadas à degradação proteica apresentam um ligeiro aumento da expressão proteica ao tempo de 1h e uma diminuição ao tempo de 24h. Note-se que este grupo apresenta uma grande variedade de spots correspondentes à proteína 1 relacionada com a cistatina (CRP1). Das proteínas do grupo de reparação de proteínas destacam-se a proteína regulada pela glucose 78 kDa (GRP78) (P20029) e a de choque térmico beta-1 (HSP27) (P42930) que apresentam um aumento de expressão ao tempo de 1h e uma ligeira diminuição às 24h. No entanto às 24h os valores de DO para estas proteínas são ainda superiores ao controlo. As restantes proteínas do grupo apresentam aos dois tempos valores de expressão próximos do controlo. No grupo de oxidação/redução a proteína superóxido dismutase [Cu-Zn] (CuZn-SOD) (P07632) apresenta uma ligeira diminuição de expressão relativamente ao controlo nos dois tempos de estudo. As proteínas superóxido dismutase [Mn] (Mn-SOD) (P07895) e peroxirredoxina

1 (Q63716) apresentam valores de expressão superiores ao controlo às 1h e 24h, verificando-se uma ligeira diminuição de expressão da peroxirredoxina do tempo de 1h para o de 24h. As restantes proteínas apresentam valores de expressão próximas da do controlo à 1h e ligeiramente superiores às 24h. No grupo ligado ao metabolismo observa-se que a expressão proteica tanto ao tempo de 1h como às 24h é semelhante ao observado no controlo. A isocitrato desidrogenase [NADP] (P54071) e a malato desidrogenase (P04635) são excepções ao grupo e apresentam uma expressão proteica superior ao controlo, em que no caso da isocitrato a expressão aumenta da 1h para as 24h. No grupo de síntese proteica observa-se que à 1h a expressão proteica é semelhante à do controlo e que a expressão aumenta às 24h, com especial destaque para a proteína SA ribossomal 40S.

Por fim, é de salientar a quantidade de *spots* identificados correspondentes à proteína 1 relacionada com a cistatina (CRP) na zona de baixo peso molecular e pH básico do gel. Este facto deverá estar relacionado com modificações pós-traducionais ou isoformas das CRP. As modificações pós-traducionais mais comuns que podem influenciar o PI e o peso molecular são a glicosilação e a fosforilação, o que pode explicar a presença de diferentes *spots* identificados como sendo a mesma proteína. (Vitorino, Lobo *et al.* 2004)

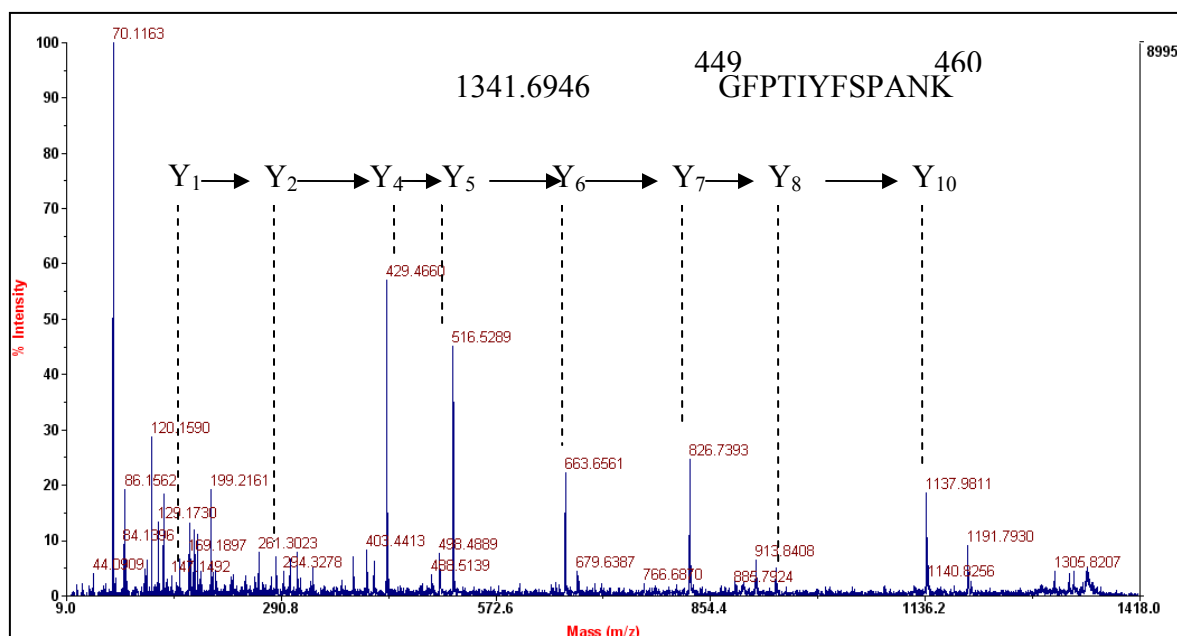
Para a análise por espectrometria de massa, foram excisados do gel 2D revelado com coomassie, 316 *spots* e os digestos trípticos foram analisados por MALDI-TOF/TOF. A título de exemplo mostra-se o espectro obtido após análise do *spot* N° 95, identificado como proteína precursora da dissulfeto isomerase A3. O espectro contém 29 picos correspondentes a peptídeos trípticos monocarregados no intervalo de massas de 800 a 4000 Da com a resolução de 15000 e com a exactidão de massas abaixo de 25 ppm. A figura 14 mostra um exemplo de um espectro MS da proteína dissulfeto isomerase A3 prec., obtido por MALDI/TOF/TOF.



**Figura 14.** Espectro de massa obtido por MALDI/TOF/TOF. As setas assinalam o ião de  $m/z$  832.3508 (coomassie) e o ião de  $m/z$  2211.1082 (autólise da tripsina) utilizados como padrão interno, e o ião de  $m/z$  1341.6946 que corresponde a um dos peptídeos utilizados para identificação da proteína dissulfeto isomerase A3.

Dos picos observados foram automaticamente seleccionados os seis mais abundantes, com razão sinal/ruído (S/N) superior a 20, para análise por MS/MS. A figura 15 mostra um exemplo de um espectro MS/MS da molécula protonada  $[M+H]^+$  de  $m/z$  1341.6946, que corresponde à sequência peptídica GFPTIYFSPANK da proteína dissulfeto isomerase A3 prec. O espectro MS/MS foi obtido no intervalo de massa de 9 até à massa do ião precursor, com uma resolução de massa de 8000 e exactidão de massa de 75 ppm. As ligações peptídicas são mais susceptíveis à quebra em MALDI/TOF/TOF, gerando iões do tipo Y. (Khatun, Ramkissoon *et al.* 2007)

Os resultados dos espectros de MS e de MS/MS foram utilizados para a pesquisa nas bases de dados.



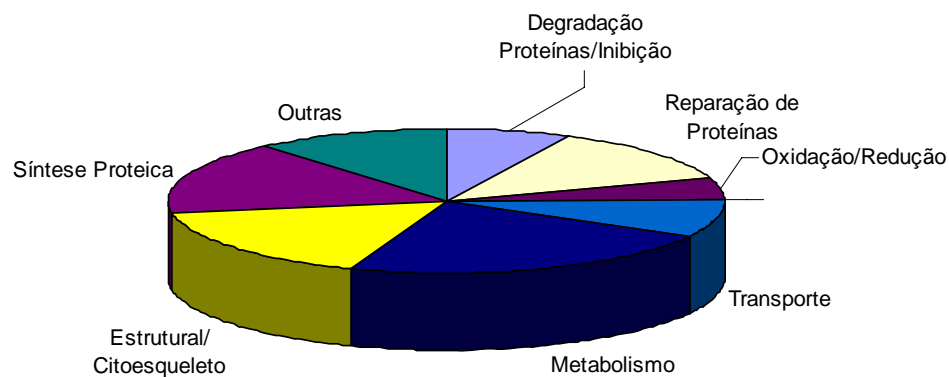
**Figura 15.** Espectro de massa (MS/MS) obtido para o peptídeo de  $m/z$  1341.6946, com a sequência de aminoácidos GFPTIYFSPANK (449-460).

### 3.2.2. Caracterização proteica por LC-MALDI/TOF/TOF

As amostras obtidas com o subfraccionamento celular das glândulas lacrimais de um dos ratos do grupo controlo foram extraídas com ácido fórmico, de forma a obter um extracto rico em péptidos. Posteriormente este extracto foi sujeito a proteólise com tripsina.

Os digestos tripticos de péptidos obtidos anteriormente foram separados por nano-HPLC e analisados no espectrómetro de massa MALDI/TOF/TOF, tendo sido identificadas 97 proteínas diferentes.

O conjunto de proteínas da glândula lacrimal identificadas foi agrupado segundo a sua função. As classes proteicas mais representativas foram as relativas ao metabolismo (23%), estrutural/citoesqueleto (16%), síntese proteica (16%), seguidas pelas classes relativas à reparação de proteínas (12%), transporte (8%), degradação proteica/inibição (7%) e oxidação/redução (5%) e ainda cerca de 11% sem função associada. Estes dados são representados no gráfico seguinte:



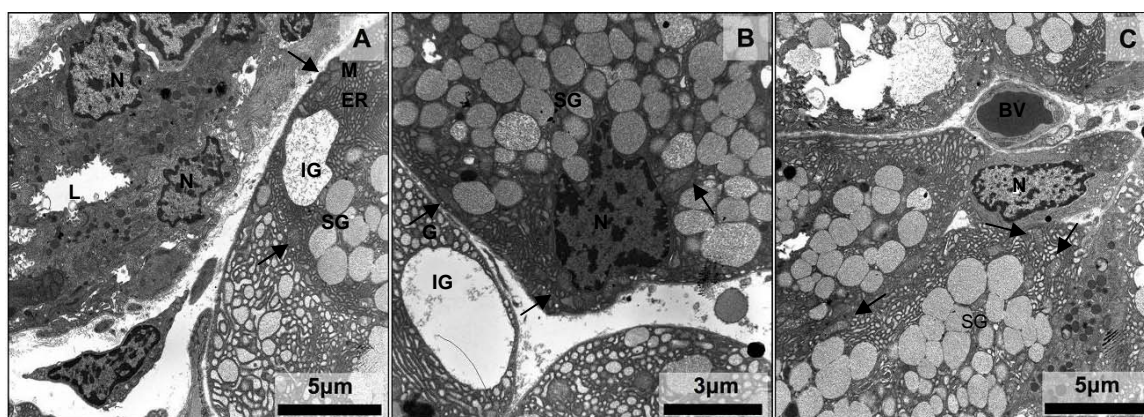
**Figura 16.** Distribuição, de acordo com função, das proteínas identificadas por LC-MALDI-TOF/TOF na glândula lacrimal.

Com os dois métodos de proteômica utilizados, 2DE-MALDI/TOF/TOF e LC-MALDI/TOF/TOF, foi possível determinar um número total de proteínas identificadas diferente. Obteve-se com a separação por cromatografia líquida cerca do dobro de proteínas em relação à separação por 2DE. No entanto, apenas foram encontradas 11 proteínas comuns entre estes dois métodos.

### 3.3. Análise morfológica das glândulas lacrimais

Após o sacrifício dos ratos foram retiradas as glândulas lacrimais. Destas foi cortada uma pequena parte com cerca de 1 mm<sup>3</sup> para caracterização morfológica por microscopia electrónica de transmissão. De seguida apresentam-se as imagens obtidas.

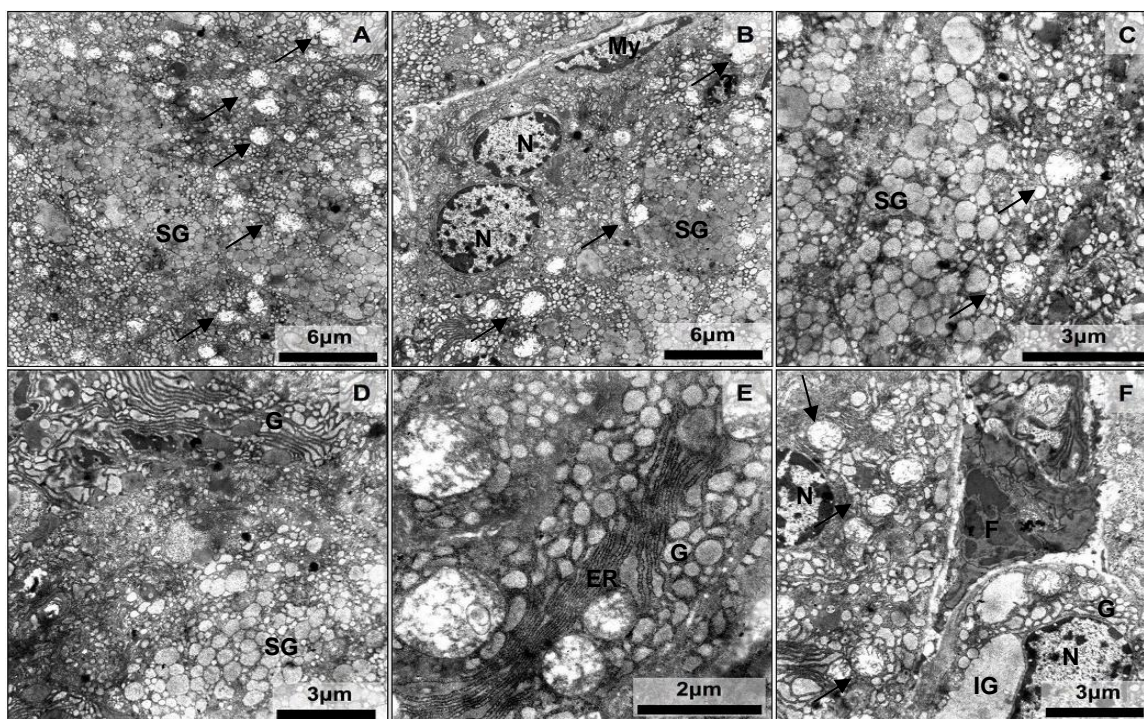
#### *Grupo Controlo*



**Figura 17.** Imagens obtidas por microscopia electrónica de transmissão de células acinares de glândula lacrimal do grupo controlo. Destacam-se as seguintes estruturas: Retículo Endoplasmático (ER), Complexo de Golgi (G), Grânulo Imaturo (IG), Grânulos Secretores (SG), Lúmen (L), Núcleo (N), Vaso Sanguíneo (BV). As setas indicam a presença de Mitocôndrias.

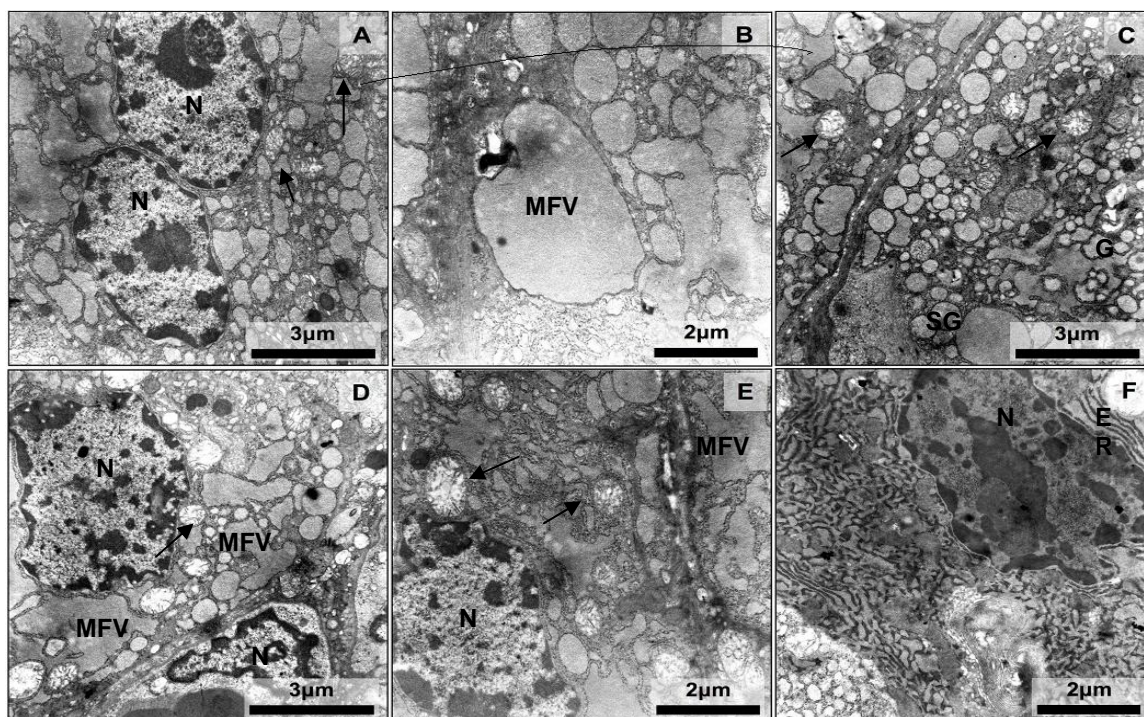
As células acinares dos ratos controlo apresentam numerosos grânulos, concentrados na zona apical, com diferentes tamanhos e matriz electrodensa. O núcleo, o Retículo Endoplasmático e o complexo de Golgi encontram-se em posição basal. A membrana plasmática basal da célula acinar apresenta-se bem delimitada e com aspecto suave. Ainda relativamente aos grânulos é possível notar a presença de grânulos imaturos, mais próximos do núcleo, na zona basal (fig. 17A, 17B).



*Grupo MDMA 1h*

**Figura 18.** Imagens obtidas por microscopia electrónica de transmissão de células acinares de glândula lacrimal do grupo MDMA 1h e sacrificados ao tempo de 1 hora. Destacam-se as seguintes estruturas: Retículo Endoplasmático (ER), Complexo de Golgi (G), Grânulo Imaturo (IG) Grânulos Secretores (SG), Núcleo (N), Fibra Nervosa (F). As setas indicam a presença de Mitocôndrias

Ao tempo de 1 hora após a última administração da MDMA observam-se algumas alterações nas células acinares. Sendo de assinalar principalmente uma diminuição do tamanho e do número aparente dos grânulos secretores (fig. 18A, 18C e 18D), *swelling* mitocôndrial (fig. 18A, 18B, 18C e 18F) e alteração estrutural do ER e do Golgi (fig. 18D). Observou-se, também zonas de perda de integridade da membrana plasmática das células acinares (fig. 18F).

**Grupo MDMA 24h**

**Figura 19.** Imagens obtidas por microscopia electrónica de transmissão de células acinares de glândula lacrimal do grupo MDMA 24h. Destacam-se as seguintes estruturas: Vesículas múltiplas de fusão (MFV) Reticulo Endoplasmático (ER), Complexo de Golgi (G), Grânulo Imaturo (IG) Grânulos Secretores (SG), Núcleo (N), Fibra Nervosa (F). As setas indicam a presença de Mitocôndrias.

Ao tempo de 24 horas continua a observar-se bastantes alterações morfológicas nas células acinares. No entanto parece haver alguma recuperação das estruturas celulares, notando-se principalmente uma diminuição do *swelling* mitocôndrial. Não é possível aferir o estado do ER e do Golgi devido à presença de numerosos grânulos em formação. Relativamente aos grânulos continua a observar-se uma alteração bastante acentuada na sua morfologia, observando-se agora, a formação de vesículas múltiplas.

# DISCUSSÃO



#### 4. DISCUSSÃO

Uma vez no sangue, as drogas são simultaneamente distribuídas pelo organismo e eliminadas. Tipicamente, a distribuição é mais rápida do que a eliminação, é realizada através da circulação sanguínea e é influenciada pelo fluxo sanguíneo. Assim atinge rapidamente o equilíbrio, primeiro nos tecidos com maior irrigação (coração, fígado, cérebro e rins) e depois no resto do corpo. Observando os valores de concentração da *ecstasy* determinados no grupo MDMA 1h é de salientar a elevada concentração determinada nos tecidos referidos anteriormente, com destaque para os valores mais elevados no rim. Mais relevantes, são as elevadas concentrações determinadas no pulmão e na glândula lacrimal, indicando que a este tempo já houve uma distribuição da droga por todo o organismo.

Os valores determinados para o coração, fígado, cérebro, rim e pulmão encontram-se de acordo com as concentrações calculadas por De Letter e colaboradores (2002) em coelho. Neste trabalho a concentração inicial administrada aos coelhos foi 40 vezes inferior (1 mg/kg), sendo os valores determinados também cerca de 40 vezes inferiores. Tendo sido este o único trabalho encontrado na literatura que visa o estudo da distribuição da MDMA em diferentes tecidos. (De Letter, Clauwaert *et al.* 2002)

A glândula lacrimal apresenta valores muito elevados de *ecstasy*, mas apesar de não serem conhecidos outros estudos semelhantes para comparação, este facto pode ser explicado pela elevada hidrofília desta droga associada ao grande movimento de água e electrólitos na glândula. Adicionalmente, e admitindo que o mecanismo de produção das lágrimas é semelhante ao da saliva, são conhecidos estudos de determinação da MDMA no fluido oral, onde foram encontrados valores da *ecstasy* até 12 vezes superiores aos do plasma. (Samyn, De Boeck *et al.* 2002; Wylie, Torrance *et al.* 2005)

De forma a determinar as possíveis consequências da elevada concentração da *ecstasy* nas glândulas lacrimais e também da acção do sistema nervoso autónomo sobre as glândulas devido à acção simpaticomimética da MDMA, foi efectuada a caracterização proteómica deste tecido.

Complementarmente à técnica separativa 2DE associada à análise por MALDI/TOF/TOF, foi efectuada também a separação da amostra por cromatografia

líquida nano e seguida da análise também por MALDI/TOF/TOF. Um dos principais méritos da análise proteómica é a capacidade de cobertura do proteoma a analisar. (Bodnar, Blackburn *et al.* 2003; Chen, Rejtar *et al.* 2005) Os resultados obtidos demonstram a complementaridade das duas técnicas utilizadas, tendo sido possível identificar um total de 142 proteínas, das quais apenas 11 são comuns entre os dois métodos. Resultando num total de 120 proteínas diferentes identificadas na fracção subcelular da glândula lacrimal.

Para uma análise compreensiva de um proteoma, idealmente deveria ser possível resolver todas as proteínas como um *spot* isolado e visualizável por 2DE. No entanto, apenas as proteínas mais abundantes são facilmente observáveis em 2DE, resultando que muitas proteínas presentes em baixa abundância podem não ser detectadas e serão omitidas de qualquer análise subsequente. O pré-fraccionamento é tido como um bom exemplo de simplificação de misturas de proteínas antes da separação por electroforese. (Lilley, Razzaq *et al.* 2002; Yarmush and Jayaraman 2002; Lopez 2007) Neste trabalho utilizou-se a centrifugação diferencial de forma a reduzir a complexidade da amostra, antes da análise por 2DE e também por LC-MALDI/TOF/TOF.

O objectivo de obter um perfil de proteínas e peptídeos representa um problema analítico complexo, devido à grande variabilidade química e diferenças de solubilidade entre os analitos. São utilizadas normalmente duas estratégias diferentes: uma incide sobre a separação de proteínas e sua análise subsequente e outra denominada de *bottom-up*, que analisa peptídeos em digestos proteolíticos. Um exemplo comum da primeira estratégia é a 2DE, que permite o estudo de alterações de expressão proteica e modificações covalentes baseadas na intensidade de coloração e na mobilidade electroforética. Para identificar as proteínas de interesse os *spots* são excisados, digeridos e os peptídeos extraídos do gel, seguindo-se a identificação por MS/MS. Por outro lado, LC-MS/MS é um exemplo de uma estratégia proteómica *bottom-up shotgun*. Esta estratégia requer a proteólise em solução de uma mistura complexa de proteínas, seguido de separação cromatográfica dos peptídeos e sequenciação por MS/MS. (Resing and Ahn 2005)

Foram utilizadas estas duas abordagens para identificação de proteínas, na tentativa de explorar os pontos fortes de cada uma, de forma a melhorar a capacidade de separação e identificação das diferentes proteínas presentes nas amostras.



As proteínas separadas utilizando a electroforese bidimensional em gel de poliacrilamida, podem ser detectadas utilizando diferentes métodos de coloração com diferentes sensibilidades. Idealmente as técnicas de coloração em proteómica devem apresentar as seguintes propriedades: sensibilidade suficiente para detectar proteínas em baixa abundância, permitir a análise quantitativa, boa linearidade e intervalo de trabalho e compatibilidade com espectrometria de massa. Infelizmente não existe um método capaz de respeitar todas estas exigências, havendo por isso vários protocolos com características diferentes. (Lopez 2007) Assim, neste trabalho optou-se por usar dois métodos diferentes, mas complementares, para fazer a caracterização das amostras provenientes dos diferentes grupos. Primeiro utilizou-se a coloração com prata, que tem elevada sensibilidade, permitindo a detecção de elevado número de *spots*, e apresenta como desvantagem a baixa linearidade. Aliando este método com programas de análise de imagens, como o PDQuest, é possível alinhar diferentes géis (*match*) obtidos a partir de amostras dos diferentes grupos, de forma a determinar diferenças e/ou semelhanças entre os padrões de expressão proteica. Numa segunda fase utilizou-se a coloração com coomassie, que requer maior quantidade de proteína, apresentando menor sensibilidade. No entanto, é de fácil compatibilização com a MS, permitindo a remoção total do corante e os *spots* a analisar geralmente possuem proteína suficiente para identificação por MS. Segundo Smales e colaboradores (2003), a reprodutibilidade dos dados quantitativos obtidos na revelação com prata é dependente da intensidade individual de cada *spot*, e é específico para cada proteína, permitindo o estudo de variação da expressão proteica entre amostras.

Apesar de observadas diferenças na expressão proteica dos diferentes grupos após coloração dos géis com prata e *matching* utilizando o PDQuest, verificou-se ser mais relevante procurar variações de densidade óptica relativa dos *spots* comuns e identificados por MALDI/TOF/TOF, pertencentes aos três grupos. Obteve-se assim, a identificação de proteínas pertencentes ao proteoma glandular e as variações da sua abundância relativa ao longo do trabalho. Outro motivo para optar por esta abordagem é o facto das variações verificadas no número e posição de *spots* entre os diferentes grupos (só foi possível obter o *match* para cerca de metade do número total de *spots*), observou-se que estas variações ocorriam em *spots* de menor intensidade, o que torna a sua identificação mais complicada.

Uma vez que a identificação das proteínas foi obtida nos géis de coomassie, foi necessário fazer a correspondência, recorrendo ao PDquest, entre a posição dos *spots*

identificados entre estes géis e os géis de prata. Admitindo que um *spot* encontrado na mesma posição em géis diferentes obtidos a partir do mesmo grupo de amostras correspondem à mesma proteína, foi assumida a identificação efectuada nos géis de coomassie como válida quando aplicada aos géis de prata.

O estudo do proteoma das glândulas lacrimais após administração de *ecstasy*, indicou a variação com o tempo de proteínas relacionadas com a defesa antioxidante, o metabolismo celular, a actividade proteolítica e a síntese proteica. De seguida é feita a descrição das principais características e funções das proteínas identificadas, mais relevantes para o trabalho e que apresentam variações de densidade óptica relativa bastante expressiva (ver tabela 4).

O retículo endoplasmático (ER) é um compartimento citoplasmático, perinuclear onde são sintetizadas proteínas e lípidos. A presença de *chaperones* facilita o correcto enovelamento das proteínas, evita a sua desnaturação e ainda previne a agregação dos estados intermediários do enovelamento proteico. A GRP78 (proteína regulada pela glucose 78 KDa) foi primeiro definida como uma proteína de 78 KDa cuja síntese era aumentada em culturas celulares mantidas em meios pobres em glucose. Mais tarde, mostrou-se ser uma proteína constitutiva do ER, cuja síntese é aumentada em resposta a diferentes condições de stress do retículo endoplasmático, provocado por diferentes condições fisiológicas. A indução da GRP78 representa um mecanismo de protecção celular em resposta ao stress do ER, com implicações na protecção da célula. (Lee 2005)

A HSP27 está envolvida no desenvolvimento de tolerância ao stress, possivelmente pelo seu envolvimento como *chaperone*, manutenção dos níveis de glutathione, e/ou modulação da função e estrutura dos microfilamentos. Níveis elevados de HSP27 foram associados a diferentes tipos de stress celular, como temperaturas elevadas, metais pesados, drogas e oxidantes. (Liu, Gilmont *et al.* 2000; Concannon, Gorman *et al.* 2003). O mecanismo preciso pelo qual HSP27 serve como protecção ao stress é bastante complexo, tendo sido sugeridos dois mecanismos de protecção principais: interacção e estabilização do citoesqueleto, facilitando a reparação ou remoção de proteínas danificadas; e a prevenção da apoptose por interferência na activação da caspase-9 e caspase-3 e actuando como modulador redox. A indução da HSP27 é transiente e a proteína regressa aos níveis basais após a remoção do factor de stress. (Concannon, Gorman *et al.* 2003)



Entre as defesas mais importantes contra os radicais de oxigénio encontram-se as enzimas superóxido dismutase (SOD). As SOD mais comuns são a CuZn-SOD, que se encontra no citoplasma celular e a Mn-SOD, que se encontra na matriz mitocondrial. (Landis and Tower 2005) Uma subexpressão de CuZn-SOD foi demonstrada em células epiteliais tipo II do alvéolo e em fibroblastos após exposição a condições de hipoxia. (Jackson, Parish et al. 1996) A Mn-SOD é expressa em muitos tipos de células e tecidos a níveis relativamente altos e é fortemente regulada por vários estímulos intracelulares e ambientais. (Zelko, Mariani et al. 2002)

A PRX1 e a PRX2 são proteínas anti-oxidantes que protegem a célula do stress oxidativo através de regulações redox e também participam na inibição da apoptose (Yamamoto, Kikkawa *et al.* 2005). Estas proteínas eram desconhecidas até ao fim dos anos oitenta e encontram-se em todos os reinos. O denominador comum em toda a família é a presença de um resíduo de cisteína altamente conservado, que é fortemente activado por ligações de hidrogénio e interacções electrostáticas na redução de hidroperóxidos. (Castro, Sousa *et al.* 2002; Hofmann, Hecht *et al.* 2002)

As mitocôndrias são uma das principais fontes de espécies reactivas de oxigénio (ROS), sendo por isso bastante susceptíveis a danos provocados por fenómenos de oxidação, podendo ocorrer danos directamente nas enzimas mitocondriais, mutações no DNA mitocondrial e alterações do que potencial transmembranar que é indicativo da integridade da membrana mitocondrial. (Jo, Son *et al.* 2001) A isocitrato desidrogenase catalisa a descarboxilação oxidativa do isocitrato a  $\alpha$ -cetoglutarato e requer NAD<sup>+</sup> e NADP<sup>+</sup>, produzindo NADH e NADPH respectivamente. O NADPH é necessário para a produção de GSH, na protecção mitocondrial contra os danos oxidativos. (Lee, Huh *et al.* 2001; Kim, Tak *et al.* 2004)

A família de cistatinas é constituída por um grande grupo de proteínas relacionadas entre si, em que a maior parte são potentes inibidores das cisteína peptidases (CPs). A quebra de ligações peptídicas é essencial em todas as células vivas, havendo um elevado número de peptidases que catalizam esta reacção com vários graus de especificidade. As CPs utilizam um resíduo de cisteína no local activo, que actua como nucleófilo na reacção. A libertação de enzimas proteolíticas fora do espaço normal pode causar degradação e patologias. Sendo por isso obrigatório o controlo da actividade enzimática proteolítica. As cistatinas formam complexos reversíveis 1:1 com as CPs, em competição com o substrato,

mas em alguns casos a ligação é tão forte que se torna fisiologicamente irreversível. O alinhamento de sequências de cistatinas permitiu identificar três regiões conservadas ao longo de mais de mil milhões de anos de evolução: um resíduo de glicina na região N-terminal, um motivo QXVXG e outro PW. No entanto, o genoma humano e de roedores possui vários genes relacionados com as cistatinas, que constituem uma pequena família multigene que codificam para glicoproteínas secretadas similares às cistatinas tipo2. Entre outros nomes, estas proteínas são conhecidas como proteína relacionada com a cistatina (CRP). É importante salientar que as CRP possuem o motivo conservado PW, mas não apresentam a glicina N-terminal nem o motivo QXVXG genericamente necessário para a inibição das CPs. Sendo por isso a função destas proteínas desconhecida. (Devos, Claessens *et al.* 1997; Dickinson 2002)

A microscopia electrónica de transmissão surge como complemento aos dados fornecidos pela quantificação da *ecstasy* na glândula lacrimal e pela caracterização proteómica. Assim foi possível observar *in situ* os efeitos directos da MDMA na morfologia celular da glândula lacrimal. No entanto, não são conhecidos trabalhos na literatura sobre a caracterização de alterações morfológicas de glândulas lacrimais de rato expostas à MDMA, ou a outros simpaticomiméticos. Assim para efeitos de comparação serão considerados trabalhos em glândulas salivares de rato e porquinho-da-índia sobre a acção de simpaticomiméticos que não a *ecstasy* publicados por Cope e colaboradores (1980) e por Malberti e colaboradores (2002).

Cope e Williams (1980) realizaram um trabalho com glândula parótida de coelho, em que após estimulação com isoprenalina verificaram as alterações estruturais nos tempos de 2, 4, 8, 12 e 16 horas pós-administração, verificando desgranulação acentuada e aumento de volume de vários organelos às 2 horas, tendo as mitocôndrias regressado ao normal às 4 horas o núcleo às 8 horas, mantendo-se o ER alterado durante todo o tempo de estudo. (Cope and Williams 1980)

Malberti e Crosa (2002) que estudaram o efeito de isoproterenol nas glândulas parótidas de porquinho-da-índia. Neste estudo, foi referida desgranulação massiva 2 horas após a administração do fármaco e desarranjo do ER. Ao fim de 24 horas as células acinares ainda não tinham regressado ao estado inicial, verificando-se a este tempo a formação de vesículas múltiplas de fusão. Foram observadas estruturas semelhantes por

Jerdeva e colaboradores (2005) em células acinares de glândulas lacrimais de coelho após adição de inibidores de miosina II (juntamente com actina filamentosa, participa no processo de exocitose), seguido de estimulação com carbacol. (Malberti and Crosa 2002; Jerdeva, Wu *et al.* 2005) Neste trabalho observou-se que as células acinares dos ratos controlo apresentavam numerosos grânulos, concentrados na zona apical, com diferentes tamanhos e com matriz electrodensa. Estes resultados encontram-se de acordo com a literatura. (Meneray, Fields *et al.* 1994; Satoh, Sano *et al.* 1997; Jerdeva, Wu *et al.* 2005) Após administração da MDMA verificaram-se algumas alterações estruturais decorrentes do processo acentuado de desgranulação, induzido pelo estímulo simpaticomimético. Há evidência de desgranulação acentuada indicada pela observação de grânulos de menor tamanho nos grupos MDMA 1h e 24h e de vesículas múltiplas de fusão no grupo MDMA 24h. Tal como nos exemplos apresentados, as principais estruturas afectadas são as mitocôndrias, o ER e o Golgi. No grupo MDMA 24h apesar de se notar uma recuperação das células acinares, esta ainda não é total, sendo de salientar que estas ainda não apresentam uma estrutura semelhante ao grupo controlo.



# CONCLUSÃO



## 5. CONCLUSÃO

Com o objectivo principal de verificar a influência da MDMA na expressão proteica das glândulas lacrimais foram analisados diferentes parâmetros do problema, como a distribuição da MDMA nos diferentes tecidos de rato, com especial atenção para a glândula lacrimal, o subfraccionamento do proteoma glandular e seu estudo e a caracterização morfológica das células acinares, nos diferentes tempos de estudo por microscopia electrónica de transmissão.

Assim, verificou-se que nas condições experimentais, ao tempo de uma hora após a última administração da MDMA é possível detectar esta droga em todos os tecidos analisados, sendo a sua concentração na glândula lacrimal bastante elevada relativamente aos restantes tecidos. Ao tempo de 24 horas não foi possível detectar a presença da MDMA em nenhuma amostra. Estes resultados sugerem que a MDMA se distribui por todo o organismo do rato, sendo posteriormente eliminado de todos os tecidos.

Pela análise da variação da densidade óptica relativa nos géis 2D revelados com prata, verificou-se que o estímulo da MDMA provoca uma variação com o tempo de proteínas relacionadas com a defesa antioxidante, o metabolismo celular, a actividade proteolítica e a síntese proteica. A utilização da técnica de separação por LC como complemento ao 2DE permitiu a identificação de um maior número de proteínas na fracção celular analisada, contribuindo para a recolha de informação fundamental na caracterização do proteoma da glândula lacrimal.

A microscopia electrónica de transmissão permitiu observar a influência da MDMA na estrutura celular da glândula lacrimal. Concluindo-se que ao tempo de 1 hora a MDMA provoca desgranulação das células acinares e alteração de várias estruturas celulares e da membrana citoplasmática. Às 24 horas há apenas indícios de recuperação celular. Estes resultados encontram-se de acordo com os dados obtidos com a análise proteómica.

Pela primeira vez foram observados os efeitos da acção simpaticomimética da MDMA sobre as glândulas lacrimais. No entanto, é necessário proceder a um estudo mais prolongado, de forma a determinar se as células acinares recuperam completamente da agressão provocada por esta droga. E também, perceber a influência de diferentes concentrações da MDMA na sua acção sobre a glândula lacrimal.

O conhecimento do proteoma da glândula lacrimal e a influência da MDMA na composição do fluido lacrimal ainda são muito limitados. Assim, é importante continuar os estudos de caracterização proteômica da glândula lacrimal e dos efeitos de diferentes fármacos simpaticomiméticos na sua expressão proteica e possível influência na constituição final do fluido lacrimal.



# **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aebersold, R. and M. Mann (2003). "Mass spectrometry-based proteomics." Nature **422**(6928): 198-207.
- Aisen, P. and A. Leibman (1972). "Lactoferrin and transferrin: a comparative study." Biochim Biophys Acta **257**(2): 314-23.
- Amado, F. M., R. M. Vitorino, P. M. Domingues, M. J. Lobo and J. A. Duarte (2005). "Analysis of the human saliva proteome." Expert Rev Proteomics **2**(4): 521-39.
- Anderson, L. C., J. R. Garrett, X. Zhang, G. B. Proctor and D. K. Shori (1995). "Differential secretion of proteins by rat submandibular acini and granular ducts on graded autonomic nerve stimulations." J Physiol **485 ( Pt 2)**: 503-11.
- Avisar, R., R. Menache, P. Shaked, J. Rubinstein, I. Machtey and H. Savir (1979). "Lysozyme content of tears in patients with Sjogren's syndrome and rheumatoid arthritis." Am J Ophthalmol **87**(2): 148-51.
- Barabino, S. and M. R. Dana (2004). "Animal models of dry eye: a critical assessment of opportunities and limitations." Invest Ophthalmol Vis Sci **45**(6): 1641-6.
- Barger, G. and H. H. Dale (1910). "Chemical structure and sympathomimetic action of amines." J Physiol **41**(1-2): 19-59.
- Bodnar, W. M., R. K. Blackburn, J. M. Krise and M. A. Moseley (2003). "Exploiting the complementary nature of LC/MALDI/MS/MS and LC/ESI/MS/MS for increased proteome coverage." J Am Soc Mass Spectrom **14**(9): 971-9.
- Bogusz, M. J. (1999). "Hyphenated liquid chromatographic techniques in forensic toxicology." J Chromatogr B Biomed Sci Appl **733**(1-2): 65-91.
- Borgonovo, B., J. Ouwendijk and M. Solimena (2006). "Biogenesis of secretory granules." Curr Opin Cell Biol **18**(4): 365-70.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-54.
- Brazier, W. J., D. K. Dhariwal, D. W. Patton and K. Bishop (2003). "Ecstasy related periodontitis and mucosal ulceration -- a case report." Br Dent J **194**(4): 197-9.
- Bromberg, B. B. (1981). "Autonomic control of lacrimal protein secretion." Invest Ophthalmol Vis Sci **20**(1): 110-6.
- Bromberg, B. B., M. M. Cripps and M. H. Welch (1989). "Peroxidase secretion by lacrimal glands from juvenile F344 rats." Invest Ophthalmol Vis Sci **30**(3): 562-8.
- Burgess, C., A. O'Donohoe and M. Gill (2000). "Agony and ecstasy: a review of MDMA effects and toxicity." Eur Psychiatry **15**(5): 287-94.
- Burn, J. H. and M. J. Rand (1958). "The action of sympathomimetic amines in animals treated with reserpine." J. Physiol. **144**: 314-336.
- Butler, D. and G. G. Guilbault (2004). "Analytical Techniques for Ecstasy." Analytical Letters **37**(10): 2003-2030.
- Cameron, R. S., P. L. Cameron and J. D. Castle (1986). "A common spectrum of polypeptides occurs in secretion granule membranes of different exocrine glands." J Cell Biol **103**(4): 1299-313.
- Carmo, H., M. Brulport, M. Hermes, F. Oesch, R. Silva, L. M. Ferreira, P. S. Branco, D. Boer, F. Remiao, F. Carvalho, M. R. Schon, N. Krebsfaenger, J. Doehmer, L. Bastos Mde and J. G. Hengstler (2006). "Influence of CYP2D6 polymorphism on

- 3,4-methylenedioxymethamphetamine ('Ecstasy') cytotoxicity." Pharmacogenet Genomics **16**(11): 789-99.
- Carvalho, M., F. Remiao, N. Milhazes, F. Borges, E. Fernandes, C. Monteiro Mdo, M. J. Goncalves, V. Seabra, F. Amado, F. Carvalho and M. L. Bastos (2004). "Metabolism is required for the expression of ecstasy-induced cardiotoxicity in vitro." Chem Res Toxicol **17**(5): 623-32.
- Castle, J. D. and A. M. Castle (1993). "Sorting and secretion of salivary proteins." Crit Rev Oral Biol Med **4**(3-4): 393-8.
- Castro, H., C. Sousa, M. Santos, A. Cordeiro-da-Silva, L. Flohe and A. M. Tomas (2002). "Complementary antioxidant defense by cytoplasmic and mitochondrial peroxiredoxins in *Leishmania infantum*." Free Radic Biol Med **33**(11): 1552-62.
- Chen, H. S., T. Rejtar, V. Andreev, E. Moskovets and B. L. Karger (2005). "Enhanced characterization of complex proteomic samples using LC-MALDI MS/MS: exclusion of redundant peptides from MS/MS analysis in replicate runs." Anal Chem **77**(23): 7816-25.
- Christophersen, A. S. (2000). "Amphetamine designer drugs - an overview and epidemiology." Toxicol Lett **112-113**: 127-31.
- Chu, T., Y. Kumagai, E. W. DiStefano and A. K. Cho (1996). "Disposition of methylenedioxymethamphetamine and three metabolites in the brains of different rat strains and their possible roles in acute serotonin depletion." Biochem Pharmacol **51**(6): 789-96.
- Chuck, R. S., J. M. Williams, M. A. Goldberg and A. J. Lubniewski (1996). "Recurrent corneal ulcerations associated with smokeable methamphetamine abuse." Am J Ophthalmol **121**(5): 571-2.
- Clemens, K. J., I. S. McGregor, G. E. Hunt and J. L. Cornish (2007). "MDMA, methamphetamine and their combination: possible lessons for party drug users from recent preclinical research." Drug Alcohol Rev **26**(1): 9-15.
- Colatrella, N. and T. E. Daniel (1999). "Crack eye syndrome." J Am Optom Assoc **70**(3): 193-7.
- Concannon, C. G., A. M. Gorman and A. Samali (2003). "On the role of Hsp27 in regulating apoptosis." Apoptosis **8**(1): 61-70.
- Cope, G. H. and M. A. Williams (1980). "Restitution of granule stores in the rabbit parotid gland after isoprenaline-induced secretion. A stereological analysis of volume parameters." Cell Tissue Res **209**(2): 315-27.
- Dannies, P. S. (1999). "Protein hormone storage in secretory granules: mechanisms for concentration and sorting." Endocr Rev **20**(1): 3-21.
- Dartt, D. A. (2001). "Regulation of lacrimal gland secretion by neurotransmitters and the EGF family of growth factors." Exp Eye Res **73**(6): 741-52.
- Dartt, D. A. (2004). "Interaction of EGF family growth factors and neurotransmitters in regulating lacrimal gland secretion." Exp Eye Res **78**(3): 337-45.
- Dartt, D. A., C. Matkin and K. Gray (1988). "Comparison of proteins in lacrimal gland fluid secreted in response to different stimuli." Invest Ophthalmol Vis Sci **29**(6): 991-5.
- De La Garza, R., 2nd, K. R. Fabrizio and A. Gupta (2007). "Relevance of rodent models of intravenous MDMA self-administration to human MDMA consumption patterns." Psychopharmacology (Berl) **189**(4): 425-34.
- De Letter, E. A., K. M. Clauwaert, F. M. Belpaire, W. E. Lambert, J. F. Van Bocxlaer and M. H. Piette (2002). "Post-mortem redistribution of 3,4-

- methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy") in the rabbit. Part I: experimental approach after in vivo intravenous infusion." *Int J Legal Med* **116**(4): 216-24.
- Detweiler, C. D., L. J. Deterding, K. B. Tomer, C. F. Chignell, D. Germolec and R. P. Mason (2002). "Immunological identification of the heart myoglobin radical formed by hydrogen peroxide." *Free Radic Biol Med* **33**(3): 364-9.
- Devos, A., F. Claessens, P. Alen, J. Winderickx, W. Heyns, W. Rombauts and B. Peeters (1997). "Identification of a functional androgen-response element in the exon 1-coding sequence of the cystatin-related protein gene *crp2*." *Mol Endocrinol* **11**(8): 1033-43.
- Dickinson, D. P. (2002). "Salivary (SD-type) cystatins: over one billion years in the making--but to what purpose?" *Crit Rev Oral Biol Med* **13**(6): 485-508.
- Ding, C., B. Walcott and K. T. Keyser (2003). "Sympathetic neural control of the mouse lacrimal gland." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**(4): 1513-20.
- Drummer, O. H. (1999). "Chromatographic screening techniques in systematic toxicological analysis." *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **733**(1-2): 27-45.
- Farris, R. L. (1985). "Tear analysis in contact lens wearers." *Trans Am Ophthalmol Soc* **83**: 501-45.
- Fenn, J. B., M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong and C. M. Whitehouse (1989). "Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules." *Science* **246**(4926): 64-71.
- Firth, A. Y. (2006). "Editorial: ocular effects of criminal drug use." *Can J Ophthalmol* **41**(2): 140-6.
- Fleckenstein, A. and J. H. Burn (1953). "The effect of denervation on the action of sympathomimetic amines on the nictitating membrane." *Br J Pharmacol Chemother* **8**(1): 69-78.
- Fung, K. Y., C. Morris, S. Sathe, R. Sack and M. W. Duncan (2004). "Characterization of the in vivo forms of lacrimal-specific proline-rich proteins in human tear fluid." *Proteomics* **4**(12): 3953-9.
- Garcia-Repetto, R., E. Moreno, T. Soriano, C. Jurado, M. P. Gimenez and M. Menendez (2003). "Tissue concentrations of MDMA and its metabolite MDA in three fatal cases of overdose." *Forensic Sci Int* **135**(2): 110-4.
- Gillette, T. E. and M. R. Allansmith (1980). "Lactoferrin in human ocular tissues." *Am J Ophthalmol* **90**(1): 30-7.
- Gorg, A., W. Weiss and M. J. Dunn (2004). "Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics." *Proteomics* **4**(12): 3665-85.
- Gorr, S. U., S. G. Venkatesh and D. S. Darling (2005). "Parotid secretory granules: crossroads of secretory pathways and protein storage." *J Dent Res* **84**(6): 500-9.
- Gowing, L. R., S. M. Henry-Edwards, R. J. Irvine and R. L. Ali (2002). "The health effects of ecstasy: a literature review." *Drug Alcohol Rev* **21**(1): 53-63.
- Grus, F. H., V. N. Podust, K. Bruns, K. Lackner, S. Fu, E. A. Dalmasso, A. Wirthlin and N. Pfeiffer (2005). "SELDI-TOF-MS ProteinChip array profiling of tears from patients with dry eye." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46**(3): 863-76.
- Grus, F. H., P. Sabuncuo, H. B. Dick, A. J. Augustin and N. Pfeiffer (2002). "Changes in the tear proteins of diabetic patients." *BMC Ophthalmol* **2**(1): 4.
- Guerrera, I. C. and O. Kleiner (2005). "Application of mass spectrometry in proteomics." *Biosci Rep* **25**(1-2): 71-93.

- Heremans, J. F. (1968). "Immunoglobulin formation and function in different tissues." Curr Top Microbiol Immunol **45**: 131-203.
- Hida, R. Y., Y. Ohashi, Y. Takano, M. Dogru, E. Goto, H. Fujishima, I. Saito, K. Saito, Y. Fukase and K. Tsubota (2005). "Elevated levels of human alpha -defensin in tears of patients with allergic conjunctival disease complicated by corneal lesions: detection by SELDI ProteinChip system and quantification." Curr Eye Res **30**(9): 723-30.
- Hodges, R. R., I. Raddassi, D. Zoukhri, A. Toker, A. Kazlauskas and D. A. Dartt (2004). "Effect of overexpression of constitutively active PKCalpha on rat lacrimal gland protein secretion." Invest Ophthalmol Vis Sci **45**(11): 3974-81.
- Hofmann, B., H. J. Hecht and L. Flohe (2002). "Peroxiredoxins." Biol Chem **383**(3-4): 347-64.
- Jackson, R. M., G. Parish and Y. S. Ho (1996). "Effects of hypoxia on expression of superoxide dismutases in cultured ATII cells and lung fibroblasts." Am J Physiol **271**(6 Pt 1): L955-62.
- Jerdeva, G. V., K. Wu, F. A. Yarber, C. J. Rhodes, D. Kalman, J. E. Schechter and S. F. Hamm-Alvarez (2005). "Actin and non-muscle myosin II facilitate apical exocytosis of tear proteins in rabbit lacrimal acinar epithelial cells." J Cell Sci **118**(Pt 20): 4797-812.
- Jo, S. H., M. K. Son, H. J. Koh, S. M. Lee, I. H. Song, Y. O. Kim, Y. S. Lee, K. S. Jeong, W. B. Kim, J. W. Park, B. J. Song and T. L. Huh (2001). "Control of mitochondrial redox balance and cellular defense against oxidative damage by mitochondrial NADP+-dependent isocitrate dehydrogenase." J Biol Chem **276**(19): 16168-76.
- Johnson, M. E. and P. J. Murphy (2004). "Changes in the tear film and ocular surface from dry eye syndrome." Prog Retin Eye Res **23**(4): 449-74.
- Jones, D. C., C. Duvauchelle, A. Ikegami, C. M. Olsen, S. S. Lau, R. de la Torre and T. J. Monks (2005). "Serotonergic neurotoxic metabolites of ecstasy identified in rat brain." J Pharmacol Exp Ther **313**(1): 422-31.
- Kalant, H. (2001). "The pharmacology and toxicology of "ecstasy" (MDMA) and related drugs." Cmaj **165**(7): 917-28.
- Karas, M. and F. Hillenkamp (1988). "Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons." Anal Chem **60**(20): 2299-301.
- Keil-Dlouha, V. V., N. Zylber, J. Imhoff, N. Tong and B. Keil (1971). "Proteolytic activity of pseudotrypsin." FEBS Lett **16**(4): 291-295.
- Khatun, J., K. Ramkissoon and M. C. Giddings (2007). "Fragmentation characteristics of collision-induced dissociation in MALDI TOF/TOF mass spectrometry." Anal Chem **79**(8): 3032-40.
- Kicman, A. T., M. C. Parkin and R. K. Iles (2007). "An introduction to mass spectrometry based proteomics-detection and characterization of gonadotropins and related molecules." Mol Cell Endocrinol **260-262**: 212-27.
- Kim, S. Y., J. K. Tak and J. W. Park (2004). "Inactivation of NADP(+)-dependent isocitrate dehydrogenase by singlet oxygen derived from photoactivated rose bengal." Biochimie **86**(8): 501-7.
- Kintz, P. and N. Samyn (1999). "Determination of "Ecstasy" components in alternative biological specimens." J Chromatogr B Biomed Sci Appl **733**(1-2): 137-43.
- Kronstrand, R., I. Nystrom, J. Strandberg and H. Druid (2004). "Screening for drugs of abuse in hair with ion spray LC-MS-MS." Forensic Sci Int **145**(2-3): 183-90.

- Kuizenga, A., N. J. van Haeringen, F. Meijer and A. Kijlstra (1996). "Analysis of human tear fluid components, inhibiting protein adhesion to plastic surfaces." Exp Eye Res **63**(3): 319-28.
- Landis, G. N. and J. Tower (2005). "Superoxide dismutase evolution and life span regulation." Mech Ageing Dev **126**(3): 365-79.
- Lane, C. S. (2005). "Mass spectrometry-based proteomics in the life sciences." Cell Mol Life Sci **62**(7-8): 848-69.
- Lee, A. S. (2005). "The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress." Methods **35**(4): 373-81.
- Lee, S. M., T. L. Huh and J. W. Park (2001). "Inactivation of NADP(+)-dependent isocitrate dehydrogenase by reactive oxygen species." Biochimie **83**(11-12): 1057-65.
- Li, N., N. Wang, J. Zheng, X. M. Liu, O. W. Lever, P. M. Erickson and L. Li (2005). "Characterization of human tear proteome using multiple proteomic analysis techniques." J Proteome Res **4**(6): 2052-61.
- Libiseller, K., M. Pavlic, P. Grubwieser and W. Rabl (2005). "Ecstasy--deadly risk even outside rave parties." Forensic Sci Int **153**(2-3): 227-30.
- Lilley, K. S., A. Razzaq and P. Dupree (2002). "Two-dimensional gel electrophoresis: recent advances in sample preparation, detection and quantitation." Curr Opin Chem Biol **6**(1): 46-50.
- Liu, C., R. R. Gilmont, R. Benndorf and M. J. Welsh (2000). "Identification and characterization of a novel protein from Sertoli cells, PASS1, that associates with mammalian small stress protein hsp27." J Biol Chem **275**(25): 18724-31.
- Lopez, J. L. (2007). "Two-dimensional electrophoresis in proteome expression analysis." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **849**(1-2): 190-202.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." J Biol Chem **193**(1): 265-75.
- Mackie, I. A. and D. V. Seal (1976). "Quantitative tear lysozyme assay in units of activity per microlitre." Br J Ophthalmol **60**(1): 70-4.
- Malberti, A. and M. Crosa (2002). "Effects induced by isoproterenol during synthesis and secretion of the parotid gland: experimental structural studies." Braz. J. morphol. Sci. **19**(1): 17-22.
- Mancinelli, R., S. Gentili, M. S. Guiducci and T. Macchia (1999). "Simple and reliable high-performance liquid chromatography fluorimetric procedure for the determination of amphetamine-derived designer drugs." J Chromatogr B Biomed Sci Appl **735**(2): 243-53.
- Maurer, H. H. (2004). "Position of chromatographic techniques in screening for detection of drugs or poisons in clinical and forensic toxicology and/or doping control." Clin Chem Lab Med **42**(11): 1310-24.
- Maurer, H. H. (2005). "Advances in analytical toxicology: the current role of liquid chromatography-mass spectrometry in drug quantification in blood and oral fluid " Analytical and Bioanalytical Chemistry **381**: 110-118.
- Maurer, H. H., J. Bickeboeller-Friedrich, T. Kraemer and F. T. Peters (2000). "Toxicokinetics and analytical toxicology of amphetamine-derived designer drugs ('Ecstasy')." Toxicol Lett **112-113**: 133-42.
- Maxwell, J. C. (2005). "Party drugs: properties, prevalence, patterns, and problems." Subst Use Misuse **40**(9-10): 1203-40.

- McClellan, B. H., C. R. Whitney, L. P. Newman and M. R. Allansmith (1973). "Immunoglobulins in tears." Am J Ophthalmol **76**(1): 89-101.
- McCooney, M. A., Z. Mester, B. Ells, D. A. Barnett, R. W. Purves and R. Guevremont (2002). "Quantitation of amphetamine, methamphetamine, and their methylenedioxy derivatives in urine by solid-phase microextraction coupled with electrospray ionization-high-field asymmetric waveform ion mobility spectrometry-mass spectrometry." Anal Chem **74**(13): 3071-5.
- Meneray, M. A., T. Y. Fields, B. B. Bromberg and R. L. Moses (1994). "Morphology and physiologic responsiveness of cultured rabbit lacrimal acini." Invest Ophthalmol Vis Sci **35**(12): 4144-58.
- Mitrevski, B. and Z. Zdravkovski (2005). "Rapid and simple method for direct determination of several amphetamines in seized tablets by GC--FID." Forensic Sci Int **152**(2-3): 199-203.
- Nakashima, K. (2005). "High-Performance Liquid Chromatographic Analysis of Drugs of Abuse in Biologic Samples." Journal of Health Science **51**(3): 272-277.
- O'Neill, D. and J. K. Dart (1993). "Methylenedioxyamphetamine ('Ecstasy') associated keratopathy." Eye **7** ( Pt 6): 805-6.
- Ohashi, Y., M. Dogru and K. Tsubota (2006). "Laboratory findings in tear fluid analysis." Clin Chim Acta **369**(1): 17-28.
- Ohashi, Y., R. Ishida, T. Kojima, E. Goto, Y. Matsumoto, K. Watanabe, N. Ishida, K. Nakata, T. Takeuchi and K. Tsubota (2003). "Abnormal protein profiles in tears with dry eye syndrome." Am J Ophthalmol **136**(2): 291-9.
- Oprea, L., A. Tiberghien, C. Creuzot-Garcher and C. Baudouin (2004). "Revue Générale: Influence des hormones sur le film lachrymal." J Fr Ophtalmol **27**(8): 933-941.
- Ortuno, J., N. Pizarro, M. Farre, M. Mas, J. Segura, J. Cami, R. Brenneisen and R. de la Torre (1999). "Quantification of 3,4-methylenedioxymetamphetamine and its metabolites in plasma and urine by gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection." J Chromatogr B Biomed Sci Appl **723**(1-2): 221-32.
- Pachigolla, G., P. Blomquist and H. D. Cavanagh (2007). "Microbial keratitis pathogens and antibiotic susceptibilities: a 5-year review of cases at an urban county hospital in north Texas." Eye Contact Lens **33**(1): 45-9.
- Patamia, M., I. Messana, R. Petruzzelli, A. Vitali, R. Inzitari, T. Cabras, C. Fanali, E. Scarano, A. Contucci, A. Galtieri and M. Castagnola (2005). "Two proline-rich peptides from pig (*Sus scrofa*) salivary glands generated by pre-secretory pathway underlying the action of a proteinase cleaving ProAla bonds." Peptides **26**(9): 1550-9.
- Paulsen, F. P. and M. S. Berry (2006). "Mucins and TFF peptides of the tear film and lacrimal apparatus." Prog Histochem Cytochem **41**(1): 1-53.
- Paulsen, F. P., A. P. Corfield, M. Hinz, W. Hoffmann, U. Schaudig, A. B. Thale and M. Berry (2003). "Characterization of mucins in human lacrimal sac and nasolacrimal duct." Invest Ophthalmol Vis Sci **44**(5): 1807-13.
- Pflugfelder, S. C., D. Jones, Z. Ji, A. Afonso and D. Monroy (1999). "Altered cytokine balance in the tear fluid and conjunctiva of patients with Sjogren's syndrome keratoconjunctivitis sicca." Curr Eye Res **19**(3): 201-11.
- Pichini, S., R. Pacifici, M. Pellegrini, E. Marchei, J. Lozano, J. Murillo, O. Vall and O. Garcia-Algar (2004). "Development and validation of a high-performance liquid chromatography-mass spectrometry assay for determination of amphetamine,



- methamphetamine, and methylenedioxy derivatives in meconium." *Anal Chem* **76**(7): 2124-32.
- Pilon, A. F. and J. Scheiffle (2006). "Ulcerative keratitis associated with crack-cocaine abuse." *Cont Lens Anterior Eye* **29**(5): 263-7.
- Poulsen, E. J., M. J. Mannis and S. D. Chang (1996). "Keratitis in methamphetamine abusers." *Cornea* **15**(5): 477-82.
- Pujadas, M., S. Pichini, S. Poudevida, E. Menoyo, P. Zuccaro, M. Farre and R. de la Torre (2003). "Development and validation of a gas chromatography-mass spectrometry assay for hair analysis of amphetamine, methamphetamine and methylenedioxy derivatives." *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **798**(2): 249-55.
- Redl, B., P. Holzfeind and F. Lottspeich (1992). "cDNA cloning and sequencing reveals human tear prealbumin to be a member of the lipophilic-ligand carrier protein superfamily." *J Biol Chem* **267**(28): 20282-7.
- Reitz, C., W. Breipohl, A. Augustin and J. Bours (1998). "Analysis of tear proteins by one- and two-dimensional thin-layer isoelectric focusing, sodium dodecyl sulfate electrophoresis and lectin blotting. Detection of a new component: cystatin C." *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **236**(12): 894-9.
- Resing, K. A. and N. G. Ahn (2005). "Proteomics strategies for protein identification." *FEBS Lett* **579**(4): 885-9.
- Rice, R. H., G. E. Means and W. D. Brown (1977). "Stabilization of bovine trypsin by reductive methylation." *Biochim Biophys Acta* **492**(2): 316-21.
- Rios, J. D., Y. Horikawa, L. L. Chen, C. L. Kublin, R. R. Hodges, D. A. Dartt and D. Zoukhri (2005). "Age-dependent alterations in mouse exorbital lacrimal gland structure, innervation and secretory response." *Exp Eye Res* **80**(4): 477-91.
- Rohrig, T. P. and R. W. Prouty (1992). "Tissue distribution of methylenedioxymethamphetamine." *J Anal Toxicol* **16**(1): 52-3.
- Sachs, R., B. M. Zagelbaum and P. S. Hersh (1993). "Corneal complications associated with the use of crack cocaine." *Ophthalmology* **100**(2): 187-91.
- Samyn, N., G. De Boeck, M. Wood, C. T. Lamers, D. De Waard, K. A. Brookhuis, A. G. Verstraete and W. J. Riedel (2002). "Plasma, oral fluid and sweat wipe ecstasy concentrations in controlled and real life conditions." *Forensic Sci Int* **128**(1-2): 90-7.
- Sapse, A. T., B. Bonavida, W. Stone, Jr. and E. E. Sercarz (1969). "Proteins in human tears. I. Immunoelectrophoretic patterns." *Arch Ophthalmol* **81**(6): 815-9.
- Satoh, Y., K. Sano, Y. Habara and T. Kanno (1997). "Effects of carbachol and catecholamines on ultrastructure and intracellular calcium-ion dynamics of acinar and myoepithelial cells of lacrimal glands." *Cell Tissue Res* **289**(3): 473-85.
- Schoenwald, R. D., S. Vidvauns, D. E. Wurster and C. F. Barfknecht (1998). "The role of tear proteins in tear film stability in the dry eye patient and in the rabbit." *Adv Exp Med Biol* **438**: 391-400.
- Skrinska, V. A. and S. B. Gock (2005). "Measurement of 3,4-MDMA and related amines in diagnostic and forensic laboratories." *Clin Lab Sci* **18**(2): 119-23.
- Soares, M. E., M. Carvalho, H. Carmo, F. Remiao, F. Carvalho and M. L. Bastos (2004). "Simultaneous determination of amphetamine derivatives in human urine after SPE extraction and HPLC-UV analysis." *Biomed Chromatogr* **18**(2): 125-31.
- Stephens, D. J. and R. Pepperkok (2001). "Illuminating the secretory pathway: when do we need vesicles?" *J Cell Sci* **114**(Pt 6): 1053-9.

- Sulzer, D., M. S. Sonders, N. W. Poulsen and A. Galli (2005). "Mechanisms of neurotransmitter release by amphetamines: a review." Prog Neurobiol **75**(6): 406-33.
- Tomosugi, N., K. Kitagawa, N. Takahashi, S. Sugai and I. Ishikawa (2005). "Diagnostic potential of tear proteomic patterns in Sjogren's syndrome." J Proteome Res **4**(3): 820-5.
- van Setten, G. B., T. Tervo, L. Viinikka, K. Pesonen, J. Perheentupa and A. Tarkkanen (1991). "Ocular disease leads to decreased concentrations of epidermal growth factor in the tear fluid." Curr Eye Res **10**(6): 523-7.
- Vitorino, R., M. J. Lobo, A. J. Ferrer-Correira, J. R. Dubin, K. B. Tomer, P. M. Domingues and F. M. Amado (2004). "Identification of human whole saliva protein components using proteomics." Proteomics **4**(4): 1109-15.
- Walcott, B. (1998). "The Lacrimal Gland and Its Veil of Tears." News Physiol Sci **13**: 97-103.
- Wilson, S. E. (1991). "Lacrimal gland epidermal growth factor production and the ocular surface." Am J Ophthalmol **111**(6): 763-5.
- Wood, M., M. Laloup, M. Ramirez Fernandez Mdel, K. M. Jenkins, M. S. Young, J. G. Ramaekers, G. De Boeck and N. Samyn (2005). "Quantitative analysis of multiple illicit drugs in preserved oral fluid by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry." Forensic Sci Int **150**(2-3): 227-38.
- Wu, K., G. V. Jerdeva, S. R. da Costa, E. Sou, J. E. Schechter and S. F. Hamm-Alvarez (2006). "Molecular mechanisms of lacrimal acinar secretory vesicle exocytosis." Exp Eye Res **83**(1): 84-96.
- Wylie, F. M., H. Torrance, A. Seymour, S. Buttress and J. S. Oliver (2005). "Drugs in oral fluid Part II. Investigation of drugs in drivers." Forensic Sci Int **150**(2-3): 199-204.
- Yamamoto, T., R. Kikkawa, H. Yamada and I. Horii (2005). "Identification of oxidative stress-related proteins for predictive screening of hepatotoxicity using a proteomic approach." J Toxicol Sci **30**(3): 213-27.
- Yan, J. X., R. Wait, T. Berkelman, R. A. Harry, J. A. Westbrook, C. H. Wheeler and M. J. Dunn (2000). "A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization-mass spectrometry." Electrophoresis **21**(17): 3666-72.
- Yarmush, M. L. and A. Jayaraman (2002). "Advances in proteomic technologies." Annu Rev Biomed Eng **4**: 349-73.
- Zelko, I. N., T. J. Mariani and R. J. Folz (2002). "Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression." Free Radic Biol Med **33**(3): 337-49.
- Zhou, L., R. W. Beuerman, A. Barathi and D. Tan (2003). "Analysis of rabbit tear proteins by high-pressure liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry." Rapid Commun Mass Spectrom **17**(5): 401-12.
- Zhou, L., R. W. Beuerman, Y. Foo, S. Liu, L. P. Ang and D. T. Tan (2006). "Characterisation of human tear proteins using high-resolution mass spectrometry." Ann Acad Med Singapore **35**(6): 400-7.
- Zoukhri, D. (2006). "Effect of inflammation on lacrimal gland function." Exp Eye Res **82**(5): 885-98.

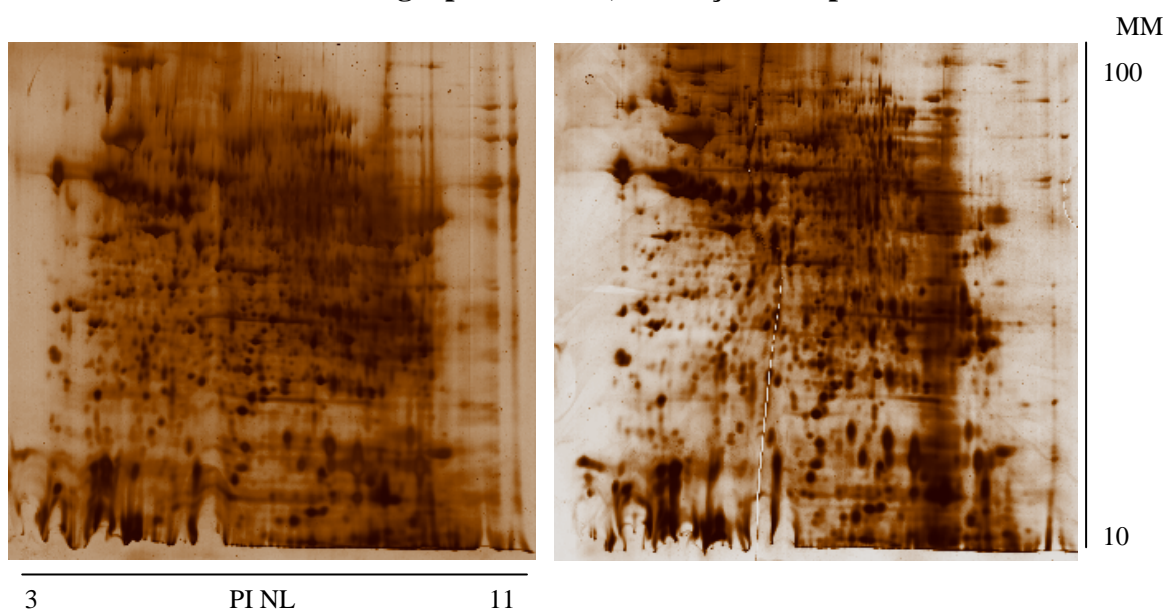
# ANEXOS



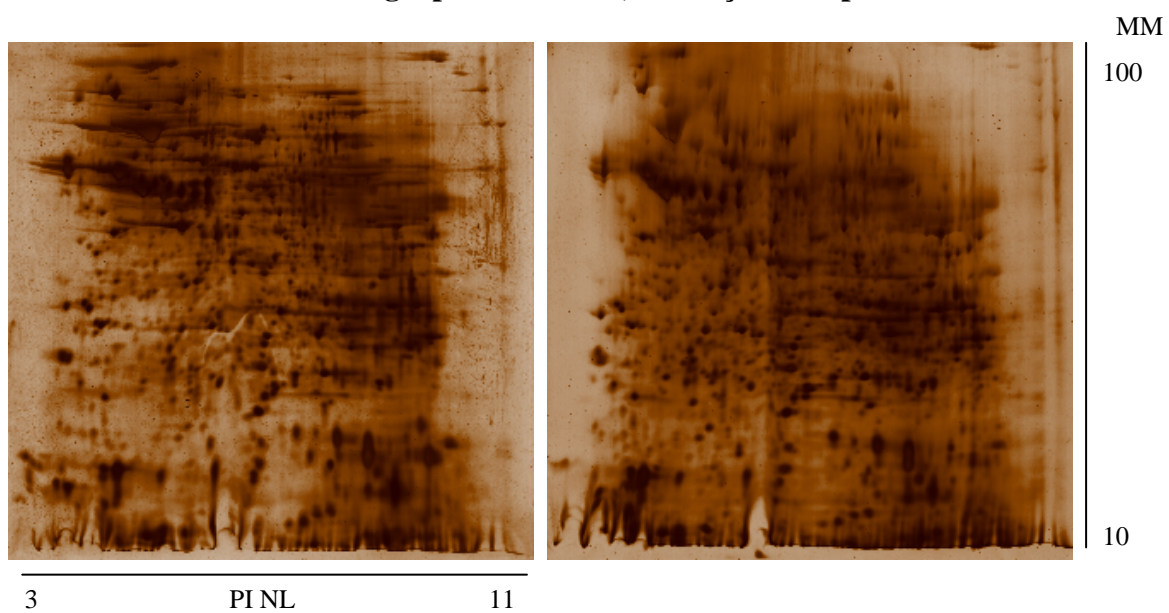
## 1. ANEXOS

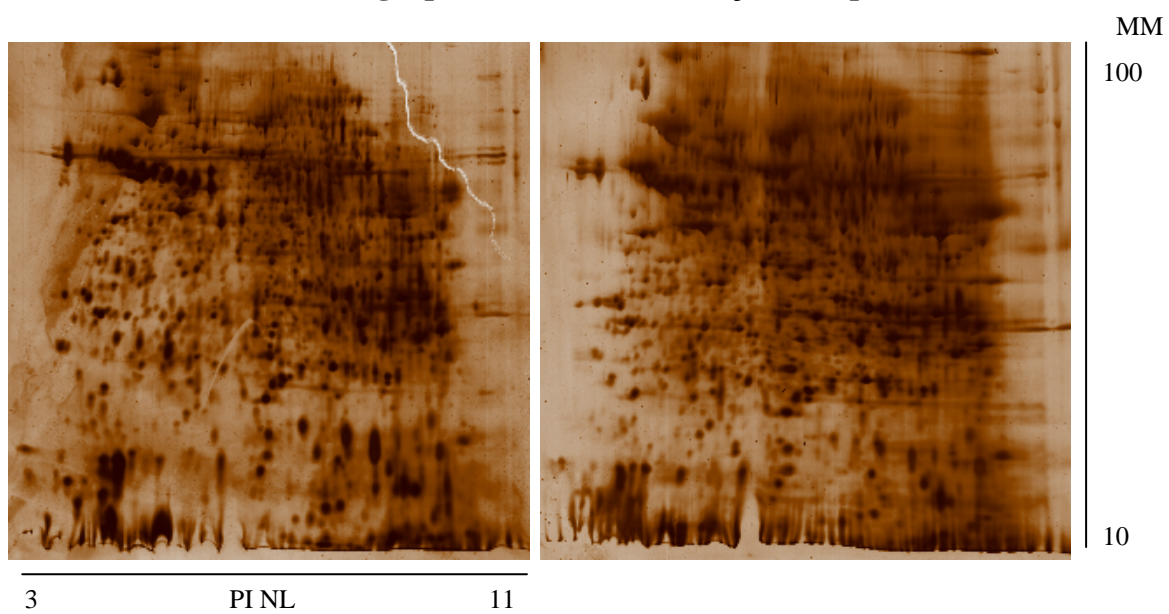
### ANEXO I

#### 2DE do grupo Controlo, revelação com prata



#### 2DE do grupo MDMA 1h, revelação com prata



**2DE do grupo MDMA 24h, revelação com prata**

## ANEXO II

## Proteínas identificadas por LC-MALDI/TOF/TOF

Nome da proteína	Número de acesso	% Cobertura Proteína
<b>Degradação Proteínas/Inibição</b>		
Cystatin-related protein 1 prec. (CRP-1)	P22282	46.6
Protein phosphatase inhibitor 2 (IPP-2)	P50411	10.7
Cathepsin B prec.	P00787	18.9
Cathepsin D	P24268	2.2
Neprilysin	P07861	5.3
Beta-mannosidase prec	Q4FZV0	8.4
Tyrosine aminotransferase	P04694	14.5
<b>Reparação de Proteínas</b>		
Calreticulin prec	P18418	69.7
78 kDa glucose-regulated protein prec (GRP 78)	P06761	48.6
Protein disulfide-isomerase A3 prec	P11598	23.2
Protein disulfide-isomerase prec	P04785	21
Protein disulfide-isomerase A6	Q63081	35.7
150 kDa oxygen-regulated protein	Q63617	22.7
Stress-70 protein, mitochondrial prec	P48721	25.5
DnaJ homolog subfamily C member 3	Q9R0T3	33.5
Protein disulfide-isomerase A5 prec	Q5I0H9	24
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B prec	P24368	33.7
UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase 1 prec	Q9JLA3	5.8
Protein disulfide-isomerase A4 prec	P38659	7.9
<b>Oxidação/Redução</b>		
Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial prec	P15650	15.6
2,4-dienoyl-CoA reductase, mitochondrial prec	Q64591	18.8
Glutathione S-transferase Yb-2)	P08010	14.7
Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial prec	Q62651	15
Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial prec	P07895	14.9
<b>Transporte</b>		
ATP synthase subunit beta, mitochondrial prec	P10719	81.5
ATP synthase subunit alpha, mitochondrial prec	P15999	40.7
Branched-chain-amino-acid aminotransferase, mitochondrial prec	O35854	26.7
Serotransferrin prec	P12346	12
ADP-ribosylation factor 1	P84079	21
Transitional endoplasmic reticulum ATPase	P46462	7.6
Electron transfer flavoprotein subunit beta	Q68FU3	19.2

Nome da proteína	Número de acesso	% Cobertura Proteína
Ras-related protein Rap-1b prec	Q62636	23.4
<b>Metabolismo</b>		
Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [acylating], mitochondrial prec	Q02253	27.9
Citrate synthase, mitochondrial prec	Q8VHF5	27.3
Aconitate hydratase, mitochondrial prec	Q9ER34	22.9
Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex core protein 2, mitochondrial prec	P32551	23.7
Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial prec	P17764	28.1
Propionyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial prec	P07633	19.2
Malate dehydrogenase, mitochondrial prec	P04636	32.5
Cytochrome c oxidase polypeptide VIa-liver, mitochondrial prec	P10818	16.2
3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2	O70351	11.1
Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial prec	P56574	15.9
Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial prec	Q9WVK7	15.6
Glycogen phosphorylase, muscle form	P09812	12.9
Ubiquinone biosynthesis protein COQ9, mitochondrial prec	Q68FT1	27.2
Pyruvate carboxylase, mitochondrial prec	P52873	7
Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial prec	Q920L2	11
Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial prec	Q64428	10.6
Alpha-N-acetylgalactosaminidase prec	Q66H12	2.7
Aldehyde dehydrogenase family 7 member A1	Q64057	6.6
N-acetylglucosamine kinase	P81799	4.7
3,2-trans-enoyl-CoA isomerase, mitochondrial prec	P23965	3.5
Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial prec	P11884	1.9
Glucagon prec	P06883	17.8
<b>Estrutural/Citoesqueleto</b>		
Collagen alpha-1(I) chain prec	P02454	58.8
Actin, cytoplasmic 2	P63259	45.3
Collagen alpha-2(I) chain prec	P02466	43.4
Serum albumin prec	P02770	15.1
Tubulin alpha-8 chain	Q6AY56	23.2
Collagen alpha-1(V) chain prec	Q9JI03	19.2
Collagen alpha-1(III) chain prec	P13941	26.2
Epsin-1	O88339	24.5
Protein piccolo	Q9JKS6	10.3
Keratin, type I cytoskeletal 18	Q5BJY9	13.2
Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate (MARCKS)	P30009	19.7



Nome da proteína	Número de acesso	% Cobertura Proteína
Fibronectin prec	P04937	6.3
Class B basic helix-loop-helix protein 8	P70562	15.2
Formin-binding protein 1	Q8R511	8.1
Actin-related protein 2/3 complex subunit 5	Q4KLF8	25.8
Plectin-1	P30427	5
<b>Síntese Proteica</b>		
Elongation factor 1-alpha 1	P62630	16.9
Elongation factor 2 (EF-2)	P05197	20.5
Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 67 kDa subunit prec	P07153	16.4
Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 63 kDa subunit prec	P25235	11.7
Eukaryotic translation initiation factor 5A-1	Q3T1J1	14.9
Transcriptional repressor CTCF	Q9R1D1	7.3
Deoxyribonuclease-1 prec	P21704	27.1
Histone H2B type 1	Q00715	31.2
40S ribosomal protein S19	P17074	18.6
Guanine nucleotide-binding protein subunit beta 2-like 1	P63245	12
Elongation factor 1-alpha 2	P62632	17.9
Nuclease sensitive element-binding protein 1	P62961	23.3
Nucleoporin 50 kDa	O08587	9.4
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	Q6URK4	16.4
60S ribosomal protein L6	P21533	14.8
Zinc finger protein 667	Q5MYW4	4.3
<b>Outras</b>		
Phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit 4	P0C0R5	7.9
Synapsin-1 (Synapsin I)	P09951	23.6
Inactive dipeptidyl peptidase 10	Q6Q629	8.9
ATP synthase O subunit, mitochondrial prec	Q06647	8
Prostatic steroid-binding protein C3 chain prec	P02780	13.7
Dihydropyrimidinase	Q63150	14.8
G-protein coupled receptor family C group 6 member A prec	Q70VB1	9.7
Pro-epidermal growth factor prec	P07522	5.5
Potassium voltage-gated channel subfamily H member 3	O89047	13.2
ADAMTS-like protein 4 precursor	Q4FZU4	11.4
A-kinase anchor protein 8	Q63014	10.9

